

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Bioquímica del surfactante pulmonar, Lisolectina :  
lisolectina Aciltransferasa del pulmón del conejo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Cristina Casals Carro**

DIRECTOR:

**Roberto Arche Rey**

**Madrid, 2015**

**María Cristina Casals Carro**

TP  
1983  
018



X-53-011432-0

**BIOQUÍMICA DEL SURFACTANTE PULMONAR. LISOLECITINA: LISOLECITINA  
ACILTRANSFERASA DE PULMON DE CONEJO**

**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1983**



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

18/83

© María Cristina Casals Carro  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1983  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-1848-1983

**M<sup>a</sup> CRISTINA CASALS CARRO**

**BIOQUIMICA DEL SURFACTANTE PULMONAR.**

**LISOLECITINA: LISOLECITINA ACILTRANSFERASA DE PULMON DE CONEJO.**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Bioquímica**

**Madrid, Mayo 1981**



"A Juan y a mis padres"

Esta investigación ha sido dirigida por el profesor Dr. Roberto Arche Rey y por la profesora Dra. Carmen Acebal Sarabia a quienes deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su constante ayuda e interés a lo largo de este trabajo.

Asimismo, quisiera hacer constar mi agradecimiento a Pilar Estrada por su inestimable colaboración y a Marilyn Cruz-Alvarez que participó en parte de la presente investigación.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento que de alguna manera han contribuido a mi formación y muy especialmente a su director, el profesor Dr. Angel Martín Municio por su orientación, interés y ayuda a lo largo de todos estos años.

Esta investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ciencias Químicas de Madrid.



## I N D I C E

I ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS .....	1
INTRODUCCION .....	1
I.1. ASPECTOS HISTO-FISIOLOGICOS DEL SURFACTANTE PULMONAR .....	3
I.1.1. Localización citológica de la síntesis del surfactante pulmonar .....	3
I.1.2. Localización subcelular de la síntesis del surfactante pulmonar .....	4
I.1.3. Formación de los cuerpos lamelares y su función en las células tipo II .....	6
I.1.4. Secreción del surfactante pulmonar y su transformación extracelular en mielina tubular .....	7
I.1.5. Degradación del surfactante pulmonar .....	9
I.1.6. Regulación hormonal de la secreción del surfactante pulmonar .....	11
I.2. COMPONENTES DEL SURFACTANTE PULMONAR .....	14
I.2.1. Composición .....	14
I.2.1.1. Componente lipídico .....	14
I.2.1.2. Componente proteico .....	15
I.2.2. Recambio de los fosfolípidos que constituyen el surfactante .....	16
I.2.3. Correlación de las funciones fisiológicas del surfactante con las propiedades químico-físicas de sus constituyentes .....	16
I.3. ASPECTOS BIOQUIMICOS .....	18
I.3.1. Procesos metabólicos en las células pulmonares. Fuente energética para la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos .....	18
I.3.2. Síntesis de fosfatidilcolina .....	20
I.3.2.1. Síntesis <i>de novo</i> .....	20
I.3.2.2. Mecanismos de remodelación. Síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina .....	25
I.3.2.2.1. Fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	28
I.3.2.2.2. Especificidad de la enzima lisolecitina aciltransferasa .....	28
I.3.2.2.3. Especificidad y características de la enzima lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa .....	31
I.3.2.2.4. Contribución de ambos mecanismos en la síntesis de di- palmitoilfosfatidilcolina .....	32
I.3.3. Síntesis de fosfatidilglicerol .....	33



1.3.4. Síntesis del surfactante pulmonar durante el desarrollo fetal y período postnatal .....	34
1.3.4.1. Variación de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de lípidos. Efecto de los corticoides .....	35
1.3.5. Influencia de los factores ambientales en la síntesis del surfactante pulmonar: Nutrición y Temperatura .....	40
OBJETIVO DE LA PRESENTE INVESTIGACION .....	42
II MATERIALES Y METODOS .....	43
II.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	43
II.2. PREPARACION DE SUSTRATOS .....	43
II.2.1. Hidrólisis de fosfolípidos .....	43
II.2.2. Criterios de pureza .....	44
II.2.3. Determinación cuantitativa de fosfolípidos .....	45
II.2.4. Síntesis enzimática de 1-(9-10 <sup>3</sup> H)-palmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina ...	45
II.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	47
II.4. AISLAMIENTO DE LA LISOLECITINA: LISOLECITINA ACILTRANSFERASA...	48
II.4.1. Aislamiento de fracción soluble .....	48
II.4.2. Precipitación con sulfato amónico. Redisolución y diálisis .....	48
II.4.3. Cromatografía en DEAE-Celulosa .....	50
II.4.4. Concentración en polietilenglicol .....	51
II.4.5. Cromatografía en ACA-44 .....	51
II.4.6. Cromatografía en Hidroxiapatito .....	52
II.4.7. Valoración de proteínas .....	54
II.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS .....	54
II.6. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR .....	57
II.7. AISLAMIENTO DE CUERPOS LAMELARES .....	57

III RESULTADOS Y DISCUSION .....	59
III.1. LOCALIZACION SUBCELULAR .....	59
III.2. AISLAMIENTO DE <i>LISOLECITINA: LISOLECITINA ACILTRANSFERASA</i> .....	60
III.2.1. Proceso de aislamiento .....	60
III.2.2. Estabilidad de la enzima .....	61
III.2.3. Efecto de agregación en presencia y ausencia de NaCl .....	62
III.2.4. Efecto del $\beta$ -mercaptoetanol en el medio .....	64
III.3. PESO MOLECULAR .....	65
III.4. MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR ADICION DE LIPIDOS. ....	66
III.4.1. Efecto de los lípidos a bajas concentraciones sobre las actividades de la enzima .....	66
III.4.2. Efecto de los lípidos a altas concentraciones sobre las actividades de la enzima .....	69
III.5. EFECTO DE ORGANULOS SUBCELULARES SOBRE LA ACTIVIDAD .....	73
III.6. PROPIEDADES ENZIMATICAS .....	74
III.6.1. Actividad de la enzima en función del tiempo .....	74
III.6.2. Variación de las actividades de la enzima en función de la concentración de proteína .....	74
III.6.3. Efecto del pH sobre las actividades de la enzima .....	77
III.6.4. Efecto de la fuerza iónica en las actividades de la enzima .....	78
III.6.5. Efecto de los cationes divalentes en las actividades de la enzima .....	80
III.6.6. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima .....	82
III.6.7. Variación de las velocidades de hidrólisis y transacilación en función de la temperatura .....	83
III.6.8. Modificación de las actividades enzimáticas en presencia de $\text{ICH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ ...	84
III.7. ESTUDIOS CINETICOS .....	86
III.7.1. Determinación de parámetros cinéticos .....	87
III.7.2. Posible mecanismo de reacción de la enzima .....	89
III.8. ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA .....	93
III.8.1. Especificidad respecto a la zona hidrófila del sustrato .....	93

III.8.1.1. Actividad de la enzima con 1-[(9, 10)- <sup>3</sup> H <sub>2</sub> ]-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y estudios de competitividad entre <sup>3</sup> H-LPE y 1- <sup>14</sup> C palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina.....	94
III.8.1.2. Estudios de competitividad entre 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfodimetiletanolamina y 1- <sup>14</sup> C palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina .....	99
III.8.2. Especificidad respecto a la zona hidrófoba del sustrato .....	100
IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	104
V. BIBLIOGRAFIA .....	109

## I. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

### INTRODUCCION

Desde el comienzo de la historia de la medicina el papel del pulmón en el intercambio de gases se reconoció como la función fisiológica primordial de este órgano. La estructura alveolar de los pulmones de mamíferos si bien resulta muy eficaz para un intercambio gaseoso eficiente, presenta problemas en el mantenimiento de la integridad estructural de los alveolos debido a su tendencia al colapso, que depende fundamentalmente, por un lado de las fibras elásticas del pulmón que se distienden durante la inspiración y retraen en la espiración y por otro, de la tensión superficial del líquido que recubre los alveolos.

Fue el físico Von Neegard en 1929 quien descubrió que la elevada tensión superficial en la interfase aire-líquido debía ser disminuída por una monocapa de naturaleza desconocida para mantener la estructura abierta e intacta de los alveolos. Efectivamente, la presión debida a la tensión superficial sería en cada alveolo:

$$P = \frac{2 \times \text{Tensión superficial}}{\text{radio del alveolo}}$$

y por tanto, considerando que la tensión del líquido intraalveolar fuera ligeramente inferior a la del agua a 37°C, existirían diferencias de presión que pueden llegar a ser grandes entre alveolos de distinto tamaño, lo que determinaría el colapso de los más pequeños durante el proceso espiratorio. Por otra parte, una presión intraalveolar elevada sobrepasaría la presión oncótica del plasma originando un edema pulmonar. En este sentido, posteriormente se demostró (Pattle, 1958 y Clements et al., 1958) que la tensión superficial en los alveolos era muy inferior a la del agua y además variaba en función del área alveolar para hacer posible la existencia de presiones intraalveolares idénticas.

Sin embargo, los estudios de Von Neegard no se continuaron. Paralelamente, Vestermark's en 1932 observó que los esputos humanos contienen grandes cantidades de lecitinas saturadas y posteriormente en 1946 Thannhauser descubrió que en el tejido pulmonar se encontraban fosfatidilcolinas disaturadas en un porcentaje mucho mayor al observado en otros tejidos. En 1950 (Popják et al.) se empieza a admitir que el pulmón tiene una síntesis activa de lípidos ya que hasta entonces dominaba el concepto de que el pulmón era un órgano sin una actividad metabólica elevada, siendo a partir de la década de los sesenta cuando queda totalmente establecido que la compleja mecánica pulmonar depende de su metabolismo y que la secreción a la superficie alveolar de una sustancia tensoactiva de naturaleza lipídica es esencial para la supervivencia del organismo.

El estudio de la composición, propiedades fisiológicas y metabolismo del surfactante

pulmonar ha sido abordado profundamente por numerosos investigadores, habiéndose publicado recientemente excelentes revisiones. (Goerke, 1974; King, 1974; Tierney, 1974; Van Golde, 1976). Nos proponemos resumir en este apartado las conclusiones más importantes que sobre el estudio del surfactante se han realizado hasta el momento y establecer un estudio crítico del avance que han supuesto estos últimos años en el conocimiento del metabolismo y regulación de la síntesis y secreción del surfactante pulmonar.

## 1.1. ASPECTOS HISTO-FISIOLOGICOS DEL SURFACTANTE PULMONAR

### 1.1.1. Localización citológica de la síntesis del surfactante pulmonar

De los 40 tipos distintos de células que al menos componen el pulmón, sólo los pneumocitos tipo II sintetizan el surfactante pulmonar, lo almacenan y secretan a la luz alveolar (Sorokin, 1967). Dichas células forman el epitelio alveolar, junto con los pneumocitos tipo I que son células de revestimiento y protección del alveolo, probablemente implicadas en el intercambio de gases. Las células tipo II son menos numerosas que las tipo I y en contraste con éstas, tienen una actividad metabólica muy intensa ya que además de su importante función de síntesis del material tensoactivo, tienen la misión de generar nuevos pneumocitos tipo I cuando son dañados por sustancias citotóxicas o altas presiones de oxígeno. Las membranas plasmáticas de ambas células se mantienen unidas por medio de desmosomas y descansan en una lámina basal de naturaleza compleja, consistente en glicoproteínas, glucosilaminoglicanos y polisacáridos separando este epitelio (Fig. 1) de las células endoteliales de los capilares alveolares y del septum interalveolar que contiene sustancia fundamental, fibras de colágeno y elásticas y algunas células septales que son fibroblastos y macrófagos. En este espacio conectivo no existen células musculares lisas, ni capilares linfáticos ni nervios.

En determinados puntos se encuentran poros alveolares que son de considerable interés ya que a través de ellos pueden intercambiarse sustancias entre el septum interalveolar y el alveolo y entre alveolos vecinos.

Las células tipo II tienen una forma cuboide y su superficie se caracteriza en su polo apical por la presencia de numerosas microvellosidades finas y de pequeño tamaño. Los orgánulos subcelulares implicados en la síntesis del surfactante son numerosos: mitocondrias, retículo endoplasmático liso y rugoso y el aparato de Golgi; pero la estructura citoplasmática que mejor caracteriza a esta célula son los cuerpos lamelares que contienen múltiples capas concéntricas de material osmiófilo. Estas vesículas son los orgánulos subcelulares implicados en el almacenamiento y secreción del material tensoactivo.

Respecto a la localización celular de la síntesis del surfactante, algunos autores (Mason et al., 1972) han indicado que los macrófagos alveolares y las células de Clara situadas al final de los bronquiolos terminales, son fuentes secundarias del surfactante. Sin embargo, recientemente Smith et al. (1979) estudiaron la síntesis de fosfatidilglicerol (componente característico del surfactante pulmonar) en un cultivo de células tipo II y macrófagos alveolares, indicando que los macrófagos no sintetizan fosfatidilglicerol y que probablemente el contenido de fosfatidilcolina disaturada observado por Mason, derive de la captura del material de recubrimiento alveolar. Esta hipótesis fue confirmada por Gottschall et al. (1979) quienes observaron figuras de mielina en vacuolas citoplasmáticas de estas células como resultado de la fagocitosis del surfactante pulmonar. Por otra parte, Yoneda (1978) ha demostrado la presencia de fosfolipasas en los

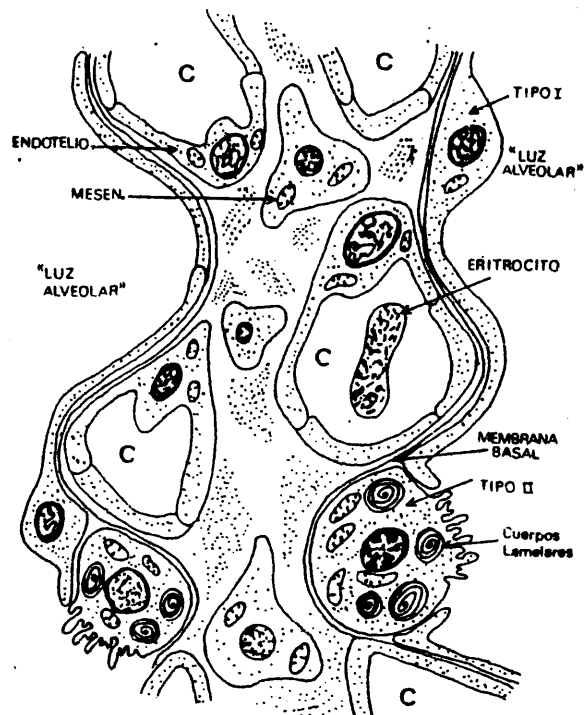


Fig. 1. Sección transversal del alveolo.

gránulos de secreción de las células de Clara, lo que hace a Gottschall et al. sugerir que dichas células están implicadas en la degradación del surfactante, al menos en condiciones patológicas de hipertrofia de los pneumocitos tipo II. Sin embargo, Petrík y Collet (1974) han atribuido el gran número de orgánulos subcelulares de síntesis observados en las células de Clara así como la presencia de un retículo endoplasmático liso muy desarrollado y la formación de gránulos de secreción no ya a una función de síntesis o degradación del surfactante pulmonar sino a la activa elaboración y secreción de proteínas, glúcidos y colesterol en la hipofase o fase más interna del líquido que recubre la superficie alveolar.

#### 1.1.2. Localización subcelular de la síntesis del surfactante pulmonar

Chevalier y Collet (1972) han descrito anatómicamente el curso de la fosfatidilcolina

sintetizada en los pneumocitos tipo II y secretada al espacio alveolar. Mediante autoradiografía electrónica siguieron la incorporación de precursores tritiados de fosfolípidos y su localización subcelular, observando que poco tiempo después de la inyección de  $^3\text{H}$ -colina, el marcaje del tritio

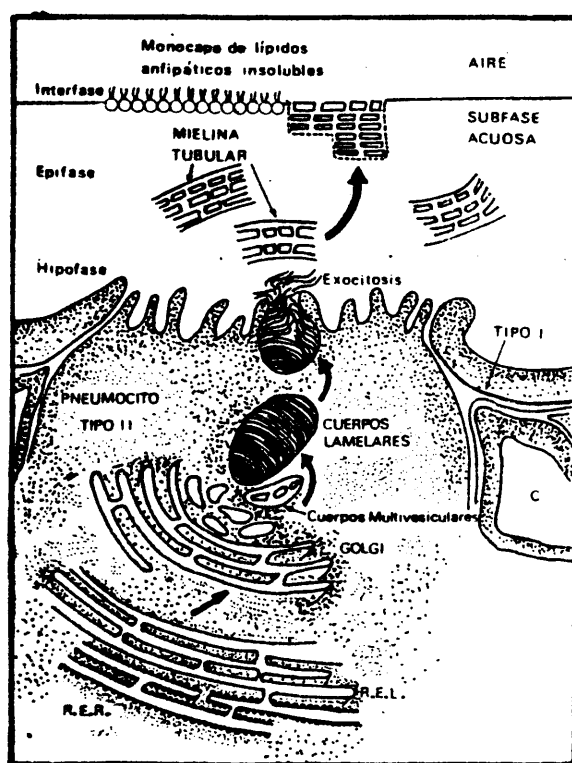


Fig. 2. Localización subcelular de la síntesis del material tensioactivo. Formación de cuerpos lamelares. Secreción del surfactante y adsorción a la superficie.

se localiza casi exclusivamente en el retículo endoplasmático. Posteriormente el marcaje aparece desde el aparato de Golgi hasta los cuerpos lamelares y finalmente en el espacio extracelular (Fig. 2). Estos resultados fueron analizados cuantitativamente por Jobe et al. (1978) estudiando la composición de fosfolípidos marcados en microsomas, cuerpos lamelares y lavado alveolar.



A partir de estudios histoquímicos y de composición de los fosfolípidos que constituyen el surfactante no es posible determinar que orgánulos están directamente implicados en la síntesis. Sin embargo, el estudio de las actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de los fosfolípidos del surfactante ha puesto de manifiesto que su biosíntesis tiene lugar asimétricamente en el lado citoplasmático del retículo endoplasmático (Coleman y Bell, 1978). Esta orientación de las actividades enzimáticas hace posible el acceso a precursores como acil-CoA, CDP-colina, CDP-etanolamina, glicerol-3-fosfato, etc, que son sintetizados por enzimas citoplasmáticas o extrínsecas de la membrana, así como de cofactores, cationes divalentes etc. (Rothman y Lenard, 1977). De esta manera la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos está regulada por los niveles de metabolitos citoplasmáticos.

La cuestión que se ha planteado durante la última década es si los cuerpos lamelares participan en la biosíntesis del surfactante pulmonar o si su función es únicamente de almacenamiento y secreción a la superficie alveolar. En este sentido, también se cuestiona si las proteínas constituyentes del material tensoactivo se adicionan al componente lipídico y se almacenan en los cuerpos lamelares hasta su secreción o se secretan directamente por los pneumocitos tipo II o las células de Clara.

### 1.1.3. Formación de los cuerpos lamelares y su función en las células tipo II

El origen de los cuerpos lamelares no se conoce con exactitud. Williams (1977) sugiere que el precursor morfológico de los mismos es un complejo Golgi - retículo endoplasmático - Lisosomas. Gil (1976) propuso que el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi están implicados en la síntesis de la fracción proteica de los cuerpos lamelares, mientras que los fosfolípidos se originan a nivel del retículo endoplasmático liso y se transfieren a los cuerpos lamelares por mediación de los cuerpos multivesiculares, de origen no determinado, pero relacionados con el aparato de Golgi.

La función de los cuerpos lamelares como almacenistas y secretores del componente lipídico del material tensoactivo está totalmente demostrada en la actualidad, por estudios histoquímicos y bioquímicos:

- a) Su composición lipídica es similar a la encontrada en el lavado alveolar, siendo los fosfolípidos mayoritarios la dipalmitoilfosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol, componentes principales del surfactante pulmonar; sin embargo, difiere de las observadas en las fracciones microsomal (Jobe et al., 1978) y mitocondrial (Rooney et al., 1975 a).
- b) Durante el desarrollo fetal la aparición de la actividad tensoactiva en el extracto de pulmón, coincide con el incremento de los cuerpos lamelares en las células tipo II. Dichas inclusiones citoplasmáticas se encuentran sólo en los pulmones fetales maduros.

- c) Antibióticos como oxitetraciclina o bleomicina (Gottschall et al., 1979) producen una hipertrofia de los pneumocitos tipo II y como consecuencia se acelera la síntesis y secreción del surfactante. La observación ultraestructural de dichas células pone de manifiesto un aumento del tamaño y número de los cuerpos lamelares, así como un aparato de Golgi más prominente acompañado de un incremento de los cuerpos multivesiculares.

Respecto al componente proteico, no hay suficientes datos, hasta el momento, que justifiquen su almacenamiento junto con el material lipídico en los cuerpos lamelares: si bien Gil y Reiss (1973) indican que el componente proteico se une al lipídico extracelularmente, Bhattacharyya et al. (1975) han demostrado que las glicoproteínas alveolares específicas se encuentran en los cuerpos lamelares de pulmón de conejo.

Aunque numerosos autores han atribuido a dichas vesículas un papel importante en la biosíntesis de fosfolípidos del material tensoactivo (Gray et al., 1974; Rooney et al., 1975a; Spitzer et al., 1975; Engle et al., 1976; Heath y Jacobson, 1976 y Spitzer y Johnston, 1978), recientemente se ha demostrado que los cuerpos lamelares no están implicados en la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol, ni en los mecanismos auxiliares de síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina (Baranska y Van Golde, 1977; Mawis et al. 1978) ni presentan actividad de "fosfolipasa A<sub>2</sub>", importante en los mecanismos de remodelación (Longmore et al., 1979), ya que todas las actividades enzimáticas detectadas en cuerpos lamelares se debían a contaminación microsomal. En este sentido, podemos concluir que la función de los cuerpos lamelares en los pneumocitos tipo II es de almacenamiento y secreción del material tensoactivo y que no participa en la biosíntesis de dicho material.

#### 1.1.4. Secreción del surfactante pulmonar y su transformación extracelular en mielina tubular

El proceso de secreción supone la fusión de las membranas de los cuerpos lamelares con la membrana plasmática, descargándose su contenido en el espacio extracelular (Fig. 2). Ryan et al. (1975) demostraron que aparentemente los cuerpos lamelares se liberan por exocitosis en una sola localización de la membrana plasmática, ya que estudios ultraestructurales han puesto de manifiesto que mientras que en la mayor parte de las células hay muy pocos sitios de exocitosis, los cuerpos lamelares recién secretados se distribuyen por gran parte de la superficie de la membrana plasmática.

El material lamelar se transforma en la subfase acuosa en unas figuras tridimensionales denominadas "mielina tubular" (Fig. 2). Su estudio mediante microscopía electrónica (Stratton 1977a) pone de manifiesto que está formada por membranas constituidas por bicapas lipídicas orientadas en ángulo recto (Fig. 3). Entre ellas queda un material homogéneo que rellena completamente el espacio interno, a excepción de una pequeña zona central.

La composición química del material homogéneo que rellena el espacio interno del

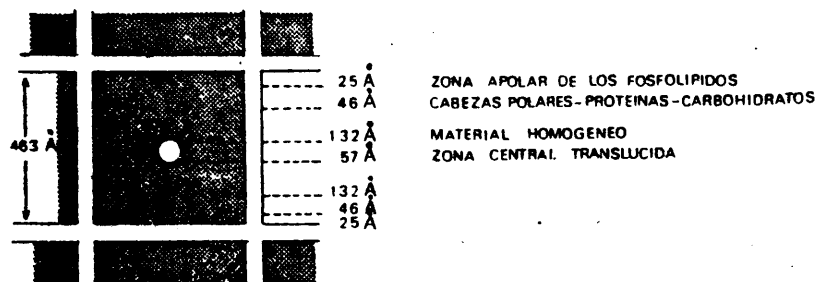


Fig. 3. Dimensiones de la mielina tubular expresadas en Angstroms. Sección transversal.

túbulo no está determinada. Se cree que los carbohidratos encontrados en la cubierta alveolar, posiblemente secretados por las células de Clara, constituyen el componente principal de dicho material. Esta hipótesis se apoya en los trabajos de algunos autores (Rooney et al., 1975a; Hallman y Gluck, 1975) que han puesto de manifiesto que la relación fosfolípidos/proteína, así como las cantidades de ambos componentes en el lavado alveolar son similares a las encontradas en los cuerpos lamelares y ya que en estos orgánulos el surfactante no está en forma de "mielina tubular", algún componente distinto de lípidos y proteínas debe estar implicado en la

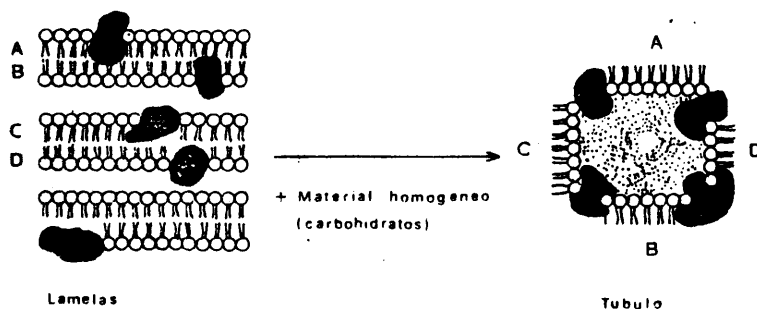


Fig. 4. Mecanismo de expansión y formación de la mielina tubular.

transformación del material contenido en los cuerpos lamelares en mielina tubular. En este sentido, Stratton afirma que dicha transformación es fundamentalmente una expansión de las lamelas, causada por la absorción en el espacio extracelular de un material homogéneo seguido de un reordenamiento de las bicapas lipídicas para formar las membranas transversales, siendo los carbohidratos, posiblemente, las sustancias implicadas en el mecanismo de expansión.

El mecanismo de formación de las membranas transversales que junto con las horizontales forman ángulos rectos, Stratton sugiere que podría ser el siguiente: (Fig. 4)

Bicapas lipídicas alternantes del material osmíófilo que se encuentra en los cuerpos lamelares, originarían las membranas horizontales y las bicapas intermedias las transversales. Esta hipótesis está apoyada por estudios morfológicos mediante microscopía electrónica.

Por otra parte Stratton (1977b) ha determinado varios estados físicos del surfactante en el espacio extracelular, siendo probablemente diferente la composición química en cada estado (Fig. 2).

- a) En la hipofase se encuentra el surfactante sin expandir en los cuerpos lamelares liberados por las células tipo II.
- b) En la epifase existe una capa de formación de la "mielina tubular" (expansión de las lamelas e incorporación del material homogéneo) y una capa de "mielina tubular" ya formada.
- c) En la interfase aire-líquido el material tensoactivo forma una monocapa o bicapa lipídica. En esta fase el material tensoactivo se enriquece en dipalmitoilfosfatidilcolina, disminuyendo la concentración de otros componentes.

#### 1.1.5. Degradación del surfactante pulmonar

En la luz alveolar, además de los cuatro estados físicos distintos del surfactante citados anteriormente, se puede observar por microscopía electrónica un quinto estado en la interfase en el que el surfactante ha perdido su capacidad tensoactiva. El surfactante degradado forma círculos o pequeñas esferas que se introducen en el líquido de revestimiento alveolar. Con frecuencia se observa que dichas esferas han perdido parte de su estructura de bicapa lipídica.

Stratton (1977b) ha observado que sólo en algunos casos se aprecia la incorporación de nueva "mielina tubular" en la zona donde se ha producido la degradación, indicando que en la mayoría de los casos el surfactante degradado se reemplaza por surfactante sin expandir, que será transformado posteriormente en mielina tubular, estado físico que hace posible el transporte y la adsorción del material tensoactivo a la interfase aire-líquido. Stratton sugiere que el surfactante debe secretarse a la luz alveolar sólo cuando va a ser utilizado. Por otra parte, dicho autor ha

observado en algunos casos, el surfactante sin expandir en diferentes estados de degradación, lo que sugiere que aparentemente una parte del surfactante secretado no encuentra el medio apropiado para su expansión y reordenamiento y se degrada sin transformarse en mielina tubular.

Las rutas catabólicas de los fosfolípidos del surfactante pulmonar todavía no han sido determinadas. En la actualidad la cuestión que se plantea es cuál es el mecanismo por el que el surfactante sin su capacidad tensoactiva, parcialmente degradado, abandona los alveolos y como se degrada el surfactante pulmonar "in situ". Se han sugerido los siguientes mecanismos:

- Degradación por macrófagos alveolares
- Degradación "in situ" por enzimas extracelulares
- Transporte transalveolar a través de los poros alveolares y degradación en las células del septum interalveolar o en las células endoteliales de los capilares alveolares.

Uno o todos estos mecanismos pueden ser operativos. Los resultados de que se dispone hasta el momento son los siguientes:

- En pulmones de rata tratadas con bromhexina, oxitetraciclina o bleomicina se observa un estado patológico caracterizado por una hipertrofia de los pneumocitos tipo II. Como consecuencia, se produce un exceso de biosíntesis y secreción de los fosfolípidos que constituyen el surfactante pulmonar (Gottschall et al., 1979). En estas condiciones se observa que los pneumocitos tipo I, los macrófagos alveolares y las células de Clara también se modifican: Tanto los macrófagos alveolares como las células tipo I fagocitan el surfactante pulmonar ya que se han encontrado en estas células vacuolas citoplasmáticas que contienen "mielina tubular". Por otra parte se pone de manifiesto un incremento de formas quiescentes de las células de Clara y su estudio indica que estas células deben estar en un continuo estado de granulación, en presencia de una elevada cantidad de fosfolípidos del surfactante (Yoneda, 1977; Evans et al., 1978). En este sentido, Yoneda (1978) demostró la presencia de fosfolipasa A<sub>2</sub> en la secreción de los gránulos de las células de Clara, de manera que éste podría ser un mecanismo de degradación "in situ" por enzimas extracelulares, al menos en el estado patológico considerado.
- Desai et al (1978) han estudiado el papel de los macrófagos alveolares en la eliminación del surfactante de la luz alveolar y su catabolismo. De los resultados obtenidos es difícil predecir si los macrófagos alveolares son las principales células responsables de la degradación intracelular o no, ya que los estudios realizados *in vitro* con cultivos celulares ponen de manifiesto que los macrófagos alveolares tienen una capacidad limitada para acumular los componentes del surfactante. Por otra parte, los estudios realizados con la fracción lisosomal de estos macrófagos indican que las enzimas lisosomales son capaces de degradar los componentes del complejo lipoproteico, pero solo el 10% del surfactante disponible se degrada hasta ácidos grasos libres después de 22 horas de incubación. Es posible que los macrófagos utilicen la fosfatidilcolina del

- surfactante directamente o bien los ácidos grasos resultantes de su degradación para la síntesis de nueva fosfatidilcolina, que es un componente mayoritario de las membranas de estas células.
- En cuanto al tercer mecanismo propuesto, Dermer (1970) observó un material denso en la superficie de las células alveolares que posiblemente corresponda al surfactante y puso de manifiesto, además, que estaba presente en las prolongaciones citoplasmáticas de las células endoteliales de los capilares alveolares. Este mecanismo de transporte transalveolar es factible por la especial histología alveolar (Fig. 1).

#### I.1.6. Regulación hormonal de la secreción del surfactante pulmonar

King (1974) sugirió que los procesos físicos en la interfase aire-líquido controlan los procesos metabólicos en los pneumocitos tipo II. Ello ha sido confirmado por Gail et al. (1978) que observaron que un aumento del tiempo de ventilación conduce a una mayor secreción del surfactante a la luz alveolar.

Los resultados obtenidos por Oyarzum y Clements (1977, 1978) trabajando con animales *in vivo* y los obtenidos por Dobbs y Mason (1979) trabajando *in vitro* en cultivos primarios de pneumocitos tipo II, son los primeros que suponen un avance significativo en el complejo estudio de la regulación hormonal de la secreción del surfactante. Estos autores han puesto de manifiesto que si bien la secreción del surfactante pulmonar es inducida por la ventilación y su velocidad depende de la amplitud de dicho proceso, los niveles del surfactante secretado están regulados bajo control neurogénico. En este sentido Oyarzum y Clements afirman que la administración de neurotransmisores (colinérgicos y betaadrenérgicos) aumentan el nivel del surfactante secretado. (Cuadro I).

Dobbs y Mason (1979) trabajando en cultivos de células tipo II, observaron que si bien los agonistas betaadrenérgicos estimulan la secreción de fosfolípidos del surfactante, quizás activando el sistema de adenilato ciclasa los agonistas colinérgicos no ejercen un efecto estimulante significativo.

Aunque el estudio *in vivo* de este proceso proporciona un modelo fisiológico adecuado, presenta algunos problemas ya que no se puede distinguir entre efectos directos o indirectos en el pulmón, o si los neurotransmisores estudiados se unen a los receptores de membrana de los pneumocitos tipo II o de otras células pulmonares. Aparentemente estos problemas se resuelven estudiando dicho proceso en cultivos celulares de pneumocitos tipo II sin embargo hay que considerar algunos problemas adicionales: a) Las células pueden resultar dañadas a nivel de membrana en el proceso de aislamiento quizás por hidrólisis enzimática de receptores o proteínas con actividades fisiológicas importantes; b) La disociación de las células del pulmón rompe las interacciones célula-célula; c) La pérdida de la diferenciación celular se pone de manifiesto en poco tiempo. Indudablemente cuando los resultados realizados *in vivo* e *in*

*vitro* en cultivos celulares, conducen a resultados análogos se pueden obtener datos concluyentes. En este sentido, la estimulación de la secreción del material tensoactivo por los agonistas betaadrenérgicos es un hecho comprobado por estudios concordantes *in vivo* e *in vitro* en el animal adulto e incluso durante el desarrollo fetal (Corbet et al., 1977 y Lawson et al., 1978). Además, dicha estimulación resulta bloqueada por los antagonistas betaadrenérgicos (propanolol) pero no por los alfaadrenérgicos (pentotamina) (Oyarzum y Clements, 1978 y Dobbs y Mason, 1979). El papel de los agonistas colinérgicos no está claro. Por un lado el efecto estimulante descrito por Oyarzum y Clements (1977) y por otros autores (Delahumty y Johnston, 1979) puede ser mediado por rutas adrenérgicas. En este sentido Abdellahf y Hollingsworth (1979) sugieren que los agonistas colinérgicos afectan indirectamente al pulmón. Ello puede ser la razón de los resultados obtenidos por Dobbs y Manson en cultivos celulares. Sin embargo, no hay que olvidar que la comunicación entre distintos tipos de células puede ser vital para la respuesta colinérgica y que habría que llevar a cabo el estudio a nivel de receptores de membrana para obtener datos concluyentes.

En el tejido fetal tampoco se ha observado un aumento de la secreción del material tensoactivo por los agonistas colinérgicos (Delahumty y Johnston, 1979; Marino y Rooney, 1980). Sin embargo, sí tienen efecto estimulante las prostaglandinas  $E_2$  (Marino y Rooney, 1980) y  $F_{2\alpha}$  (Anderson et al., 1978). Se ha comprobado (Powell y Solomon, 1978) que la prostaglandina  $E_2$  se sintetiza en el pulmón fetal y la velocidad de síntesis va en aumento a lo largo del desarrollo, y que además las células tipo II del pulmón fetal de rata sintetizan predominantemente prostaglandina  $E_2$  (Shapiro et al., 1978). Por otra parte, Oyarzum y Clements también han observado en animal adulto el efecto estimulante de las prostaglandinas.

CUADRO I

## REGULACION DE LA SECRECION DEL SURFACTANTE PULMONAR

NEUROTRANSMISORES Y HORMONAS	EFFECTO EN LA SECRECION DE DPPC	METODO DE ESTUDIO	REFERENCIAS
Agonistas beta adrenérgicos (epinefrina, nor epinefrina, isoprenol, terbutalina)		"in vivo" (conejo) en cultivo celular (rata) desarrollo fetal (conejo) desarrollo fetal (cordero)	Oyarzum y Clements (1978) Dobbs y Mason (1978) Corbet et al. (1977) Lawson et al. (1978)
Agonistas colinérgicos (acetilcolina, carbamilcolina, metilcolina, pilocarpina)		"in vivo" (conejo) cortes de tejido (Hamster)	Oyarzum y Clements (1977) DeLahumty y Johnston (1979)
		en cultivos celulares (rata) en cortes de tejido fetal (conejo y hamster)	Dobbs y Mason (1979) DeLahumty y Johnston (1979) Marino y Rooney, (1980)
Agonistas alfa adrenérgicos (fenilepinefrina)		en cultivos celulares (rata)	Dobbs y Mason (1979)
Antagonistas beta adrenérgicos (propanolol)		"in vivo" (conejo) en cultivos celulares (rata)	Oyarzum y Clements (1978) Dobbs y Mason (1979)
Prostaglandinas E <sub>2</sub> o/y F <sub>2α</sub>		"in vivo" (conejo) cultivo celular (rata) cortes de tejido fetal (conejo)	Oyarzum y Clements (1978) Anderson et al. (1978) Marino y Rooney (1980)



## 1.2. COMPONENTES DEL SURFACTANTE PULMONAR

### 1.2.1. Composición

King y Clements (1972) han puesto de manifiesto que el material tensoactivo aislado de pulmón de mamífero está constituido por lípidos (80-90% en peso) y proteínas (10-20% en peso). Los fosfolípidos constituyen del 80-90% en peso de los lípidos totales mientras que los lípidos neutros tan sólo del 5-15%.

Todos los estudios realizados hasta el momento coinciden en que la principal especie molecular aislada del lavado alveolar es un fosfolípido con propiedades tensoactivas: dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina. Ello contrasta con las bajas concentraciones de éste fosfolípido presentes en otros tejidos (King 1974) exceptuando cerebro (Kuksis et al. 1968) y eritrocitos (Maraj y Kuksis 1969).

El comportamiento de la dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina *in vivo* está totalmente influenciado por otros fosfolípidos y proteínas que forman parte del surfactante (Van Golde 1976) así como del medio iónico (Chapman et al. 1977). En este sentido, es importante conocer la composición del material tensoactivo, siendo su determinación un problema complejo ya que depende del material biológico utilizado así como del método de aislamiento y fraccionamiento a partir del lavado alveolar.

#### 1.2.1.1. Componente lipídico

Quizás uno de los trabajos más relevantes sobre la composición de los fosfolípidos del surfactante sea el realizado por Jobe et al. (1978) que estudiaron *in vivo* la incorporación de precursores marcados radioactivamente en los fosfolípidos del lavado alveolar, cuerpos lamelares, microsomas y parénquima pulmonar.

La composición de fosfolípidos observada en el lavado alveolar es en orden decreciente: 84% PC; 5% PG; 5% PI; 3.6% PE; 0.6% SP y 0.4% PS. Esta composición es muy similar a la encontrada en cuerpos lamelares y diferente a la de la fracción microsomal y parénquima pulmonar.

Las concentraciones relativas a PE, PS y SP disminuyen 5, 10 y 20 veces respectivamente desde las fracciones microsomal y parénquima a las fracciones que contienen el material tensoactivo. En contraste las concentraciones relativas a PC y PG incrementan 1.5 y 3.5 veces respectivamente. El PI incrementa ligeramente.

El PG se encuentra sólo en muy pequeñas cantidades en la mayoría de los tejidos de

mamíferos. Sin embargo, en los cuerpos lamelares y lavado alveolar se encuentra en cantidades significativas (Hallman et al., 1976). Pflieger et al. en 1972 propusieron que el PG era un estabilizador del complejo lipo-proteico. Actualmente se le considera además, un indicador bioquímico del surfactante pulmonar al igual que la dipalmitoilfosfatidilcolina, ya que se ha encontrado en cantidades significativas en los cuerpos lamelares de las células tipo II (Engle et al., 1980; Dobbs et al., 1980; Mason y Dobbs, 1980; Smith et al., 1980; Mason y Williams, 1980) y no en otras fracciones de estas células (Basu et al., 1979) o en otras células del tejido pulmonar. Por otra parte el contenido de dichos fosfolípidos indica el grado de diferenciación de los cultivos de pneumocitos tipo II.

El PI se ha estudiado muy poco como posible componente del surfactante pulmonar. En este sentido, Hallman y Gluck (1976) observaron que durante el desarrollo fetal la aparición de DPPC, PG y PI coincide con la maduración del pulmón lo que revela la importancia de estos glicerolípidos para la funcionalidad del surfactante.

Por otra parte Jobe et al. determinaron que el porcentaje de ácidos grasos saturados en PC, PG y PI en los cuerpos lamelares y lavado alveolar es mayor que en la fracción microsomal. En contraste la PE y PS contienen el mismo porcentaje de ácidos grasos saturados en todas las fracciones estudiadas que es del 20% frente al 69% para la fosfatidilcolina en el lavado alveolar.

Los lípidos neutros que constituyen del 5-15% de los lípidos totales del surfactante pulmonar, comprenden en orden decreciente de concentración relativa: colesterol libre > triglicéridos > diglicéridos > monoglicéridos > ácidos grasos libres. Hass y Longmore (1979) han determinado que el colesterol representa el 50% de los lípidos neutros en el lavado alveolar y cuerpos lamelares. La función del colesterol en el surfactante pulmonar todavía no está clara. Tabak y Notler (1975) han sugerido que el colesterol favorece la dispersión del surfactante hacia la interfase aire-líquido y que además aumenta su estabilidad.

#### *1.2.1.2. Componente proteico*

Proteínas unidas al material tensoactivo se han localizado en la interfase alveolar por inmunofluorescencia (King 1974). Dichas proteínas no se encuentran en el plasma y permanecen unidas a la fracción tensoactiva en las diferentes etapas de la purificación. Se ha llevado a cabo el aislamiento de estas proteínas y su electroforesis en gel de poliacrilamida, con SDS, revela la presencia de tres proteínas diferentes, siendo las mayoritarias de 11.000 y 34.000 D y la minoritaria de 69.000 D (Sawada, 1977a y 1977b). El estudio de su metabolismo en las células tipo II se ha empezado a estudiar recientemente por King y Martin (1979) y no se dispone hasta el momento de datos concluyentes.

### 1.2.2. Recambio de los fosfolípidos que constituyen el surfactante

La vida media de los fosfolípidos pulmonares ha sido determinada por Jobe et al (1978) en las fracciones microsomal, parénquima lavado alveolar y cuerpos lamelares de pulmón de conejo. La desaparición de los fosfolípidos marcados radioactivamente se midió en un periodo de tres días después de la administración de  $^3\text{H}$ -glicerol y  $^{14}\text{C}$ -palmitato, *in vivo*, observando que la fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol tienen un recambio mucho más rápido que cualquiera de los otros fosfolípidos pulmonares, en todas las fracciones estudiadas. Los valores de vida-media para los fosfolípidos del lavado alveolar marcados con  $^3\text{H}$ -glicerol ó  $^{14}\text{C}$ -palmitato son en orden decreciente: fosfatidilglicerol < fosfatidilcolina < fosfatidilinositol < fosfatidiletanolamina = fosfatidilserina.

Tanto la dipalmitoilfosfatidilcolina como el fosfatidilglicerol, componentes característicos del surfactante, son metabolizados activamente mientras que la fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, componentes integrales de la membrana (Basu et al. 1979), tienen una vida-media mayor.

### 1.2.3. Correlación de las funciones fisiológicas del surfactante con las propiedades químico-físicas de sus constituyentes

El surfactante pulmonar tiene dos propiedades fundamentales: La capacidad de disminuir la tensión superficial al reducirse al área del alveolo y su movilidad en la subfase acuosa y capacidad de adsorción en la interfase aire-líquido. Estas propiedades están estrechamente correlacionadas con la naturaleza de los componentes del complejo (King, 1974 e Hildebran et al., 1979).

De los lípidos que constituyen el material tensoactivo sólo las fosfatidilcolinas disaturadas son capaces de disminuir la tensión superficial alveolar a menos de 10 dinas/cm.:

- La presencia de dos ácidos grasos saturados en su zona apolar hace posible la compresión hasta un área molecular que es dos veces menor que la calculada para cada ácido graso individual. La gran proximidad de las cadenas hidrocarbonadas maximiza las interacciones hidrofóbicas inter e intra moleculares. Efectivamente, al reducirse el área del alveolo la película superficial se comprime forzando los fosfolípidos con grupos acilos que contienen uno o mas enlaces cis-etilénicos hacia fuera y enriqueciéndose ésta de fosfolípidos saturados, principalmente de DPPC.
- La zona polar de la molécula de fosfatidilcolina situada en la fase acuosa, tiene a pH fisiológico carga neta cero lo que minimiza la repulsión entre cargas. En este sentido, los fosfolípidos con carga negativa (PS, fosfolípidos ácidos) a este pH, inestabilizarían la compresión de la película.

Además de disminuir la tensión superficial a menos de 10 dinas/cm, el surfactante debe mantener este valor en un tiempo corto, pero medible, para prevenir el colapso alveolar. De todas las fosfatidilcolinas disaturadas la *dipalmitoilfosfatidilcolina* es la única que satisface este requerimiento. Se ha comprobado que una monocapa de diestearoilfosfatidilcolina si bien puede reducir la tensión superficial al valor indicado, colapsa casi instantáneamente. Por otra parte, los estudios del colapso de la película alveolar, *in situ*, han puesto de manifiesto que éste es más rápido que el observado con una monocapa superficial de *dipalmitoilfosfatidilcolina*. Ello demuestra que el complejo tensoactivo tiene otros constituyentes además de DPPC lo que está de acuerdo con los estudios realizados respecto a su composición.

Con respecto a la movilidad en la fase acuosa y la capacidad de adsorción del surfactante a la interfase aire-líquido se ha comprobado que la velocidad de adsorción de la DPPC es demasiado lenta para ser fisiológicamente eficaz (King y Clements, 1972) sin embargo, la velocidad observada con el complejo entero es muy rápida. La adición a la DPPC de fosfolípidos monoenoicos y lípidos neutros (triglicéridos y colesterol) aumenta la velocidad de transporte a la interfase hasta un valor mas parecido al requerido fisiológicamente. La base fisico-química de estos hechos es un cambio de estado físico: una propiedad única de las estructuras de bicapa es su capacidad para sufrir una transición reversible de un estado altamente ordenado cuasi cristalino, a un estado desordenado de *crystal-líquido* caracterizado por una gran movilidad molecular, a una temperatura crítica (TC) (Sandermann, 1978). En este sentido, la temperatura crítica de transición de fase para la DPPC es 41°C, mientras que para las fosfatidilcolinas monoenoicas y colesterol está por debajo de los 37°C lo que indica que a la temperatura fisiológica la DPPC se encuentra en un estado ordenado, de gel. Ello explica la presencia en el complejo tensoactivo de otros fosfolípidos con ácidos grasos insaturados, colesterol proteínas y posiblemente carbohidratos ya que disminuyen la temperatura crítica de transición de fase del complejo entero, de forma que a la temperatura fisiológica se encuentra en un estado de *crystal-líquido* en el que los fosfolípidos de las bicapas tienen mayor movilidad, aumentándose de este modo la velocidad de transporte y adsorción a la interfase.

Considerando todos estos hechos se puede concluir que el complejo tensoactivo sólo es funcional con todos sus componentes y que la composición química del complejo debe variar en función de los requerimientos fisiológicos. En este sentido, la concentración de *dipalmitoilfosfatidilcolina* será mayor en la superficie aire-líquido que en las subfases acuosas (epi o hipofase) y que en los cuerpos lamelares, por exclusión de otros componentes no tensoactivos del complejo. Asimismo, en la subfase acuosa la proporción de los componentes no tensoactivos (fosfolípidos monoenoicos, lípidos neutros y proteínas) será mayor que en la película superficial en orden a incrementar la movilidad y la velocidad de transporte de dicho material a la superficie alveolar.

### 1.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

#### 1.3.1. Procesos metabólicos en las células pulmonares. Fuente energética para la síntesis "de novo" de ácidos grasos.

La velocidad de síntesis de ácidos grasos en el tejido pulmonar es aproximadamente la mitad de la velocidad basal observada en hígado (Gove y Hems, 1978). No obstante, teniendo en cuenta que la función primordial del pulmón es el intercambio de gases respiratorios, la velocidad de síntesis de ácidos grasos es bastante elevada, lo que es debido en parte al rápido recambio observado para la fosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol (Jobe et al., 1978) y a la especificidad por palmitato en la producción de dipalmitoilfosfatidilcolina. En este sentido, numerosos investigadores y recientemente Batenburg et al., (1978), Smith y Kikkawa, (1978) y Jobe et al., (1978) han demostrado que el ácido palmítico es el principal producto de la síntesis de ácidos grasos en pulmón.

Teniendo en cuenta la sustancial producción de ácidos grasos, sería interesante estudiar cuál es la fuente del esqueleto carbonado. En órganos lipogénicos tales como el hígado o el tejido adiposo, la síntesis se estimula por elevados niveles de glucosa y lactato en sangre en orden a almacenar el exceso de carbohidratos en forma de lípidos. Sin embargo, en pulmón Buechler y Rhoades (1980) ponen de manifiesto que la síntesis de ácidos grasos no se estimula por niveles altos de glucosa o lactato en sangre ( $> 20$  mM), lo que es debido probablemente a que la lipogénesis en este órgano da lugar a lípidos estructurales, es decir fosfolípidos. En este sentido, se ha demostrado que las células pulmonares presentan una transferencia muy lenta de equivalentes de reducción entre el citoplasma y la mitocondria ya que las actividades de las lanzaderas malato-aspartato y  $\alpha$ -glicerolfosfato son muy bajas. De este modo los niveles elevados de NADH citoplasmático favorecen la transformación de piruvato en lactato, de ahí la alta velocidad observada en la ruta glicolítica. Asimismo, concentraciones altas de lactato no estimulan la síntesis de ácidos grasos ya que ésta sería dependiente de la transformación de lactato en piruvato, lo que requiere la reducción de una molécula de NAD<sup>+</sup>. En este sentido Buechler y Rhoades concluyen que si bien la glucosa y el lactato son la fuente más importante de acetyl-CoA para la síntesis de novo de ácidos grasos en pulmón, los niveles elevados en sangre de dichos metabolitos no estimulan la lipogénesis como en otros tejidos.

Por otra parte, se ha demostrado que la oxidación de ácidos grasos (Basset et al., 1979) así como de aminoácidos (Scholz y Evans, 1977) también contribuyen a la síntesis de ácidos grasos aunque en menor proporción.

Otro hecho de considerable interés es que en pulmón la enzima *málica*, generadora de NADPH, no existe o tiene una actividad muy baja. Debido a la ausencia de este sistema cíclico, la ruta de las pentosas debe asumir totalmente la función de suministrar NADPH necesario para la biosíntesis de ácidos grasos. En este sentido, Buechler y Rhoades demostraron que la disminución

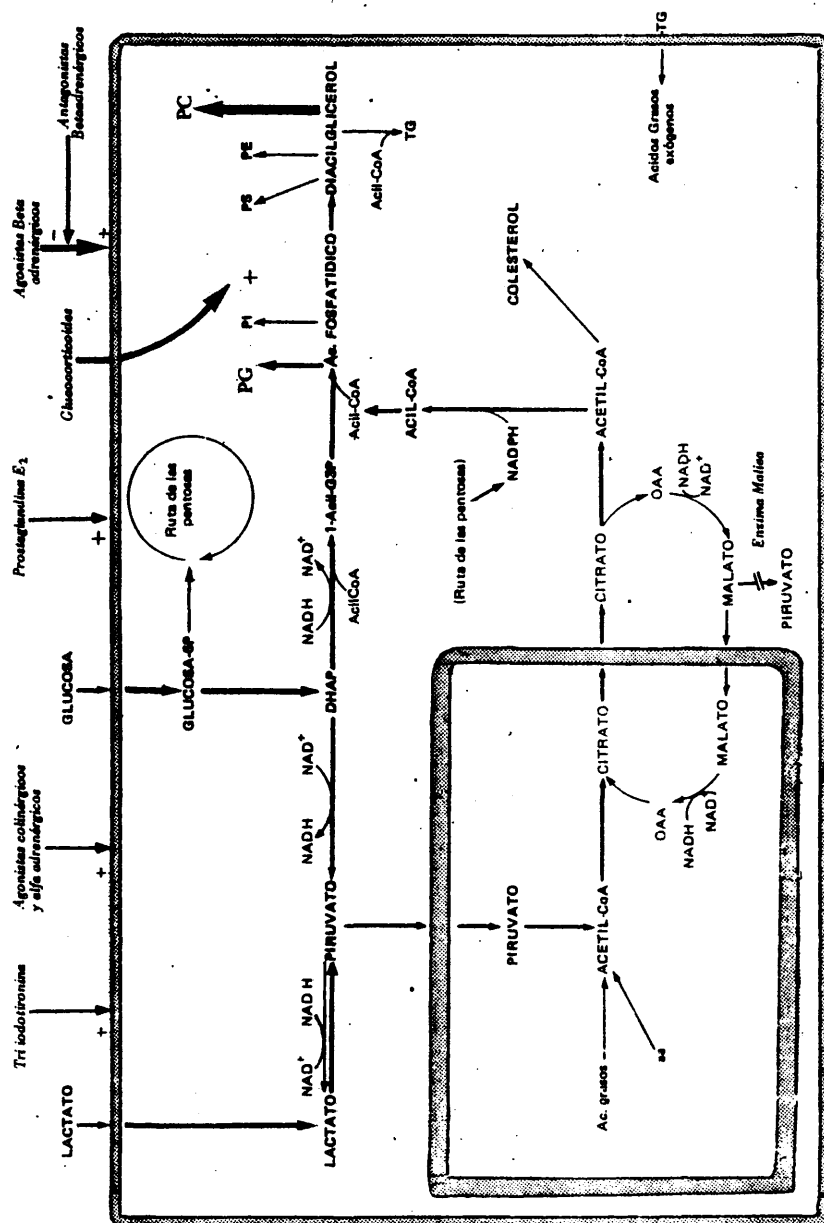


Fig. 5. Rutas metabólicas esenciales para la síntesis del surfactante

de la efectividad de la ruta de las pentosas con 6-aminonicotinamida produce un marcado decrecimiento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Además, estados fisiológicos límites como el ayuno prolongado, o patológicos como la diabetes, inducen una gran disminución en la síntesis de ácidos grasos ya que la glucosa es el metabolito esencial para la producción de unidades de dos átomos de carbono, NADPH (ruta de las pentosas) y el esqueleto central de los fosfolípidos:  $\alpha$ -glicerofosfato (Fig. 5).

Recientemente se ha demostrado en estudios con pulmón de rata *in vivo* (Jobe, 1979 y Jobe et al., 1980) y en cultivos de neumocitos tipo II (Mason et al., 1977) que el ácido palmítico sintetizado a partir de acetato se incorpora preferentemente en fosfatidilcolina y en dipalmitoilfosfatidilcolina, lo que sugiere que la síntesis *de novo* del ácido palmítico es de gran importancia en el metabolismo del surfactante pulmonar. La posible explicación de este hecho es que el ácido palmítico sintetizado *de novo* en el citoplasma puede ser mas accesible para las reacciones de transferencia de acilo, implicadas en la síntesis de PC, que el ácido palmítico exógeno procedente del torrente sanguíneo. De acuerdo con esta hipótesis Groener y Van Golde (1978) afirman que en cultivos celulares de hepatocitos aislados se pueden distinguir dos clases de ácidos grasos: los de origen exógeno y los sintetizados *de novo* en la propia célula. Los últimos estudios de Engle et al., (1980) confirman estos resultados concluyendo que el ácido palmítico de la dipalmitoilfosfatidilcolina deriva del sintetizado *de novo* en la célula y no del suministrado por los lípidos del suero.

### 1.3.2. Síntesis de fosfatidilcolina

Durante la última década las rutas metabólicas de la fosfatidilcolina disaturada han sido estudiadas por numerosos investigadores, mediante trabajos realizados en fracciones subcelulares del pulmón e *in vivo* (Van Golde, 1976). Por otra parte, el desarrollo de la técnica de aislamiento de neumocitos tipo II ha hecho posible, en estos últimos años, el estudio de la biosíntesis del surfactante pulmonar en dichas células, que constituyen sólo el 10-15% de la totalidad de la población celular del pulmón. Los resultados obtenidos han clarificado ciertas indeterminaciones derivadas de los estudios *in vitro* e *in vivo* y han puesto de manifiesto nueva información respecto a la utilización de sustratos y a la determinación de rutas metabólicas predominantes. En este sentido, sería necesario establecer una confrontación de los resultados experimentales en orden a reafirmar algunas conclusiones.

#### 1.3.2.1. Síntesis *de novo*

La figura 6 muestra la síntesis *de novo* de la fosfatidilcolina pulmonar, incluyendo las posibles vías de formación del  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato<sub>(a)</sub>, así como del ácido lisofosfatídico<sub>(b)</sub>. Las conclusiones más importantes que derivan de los trabajos realizados son las siguientes:

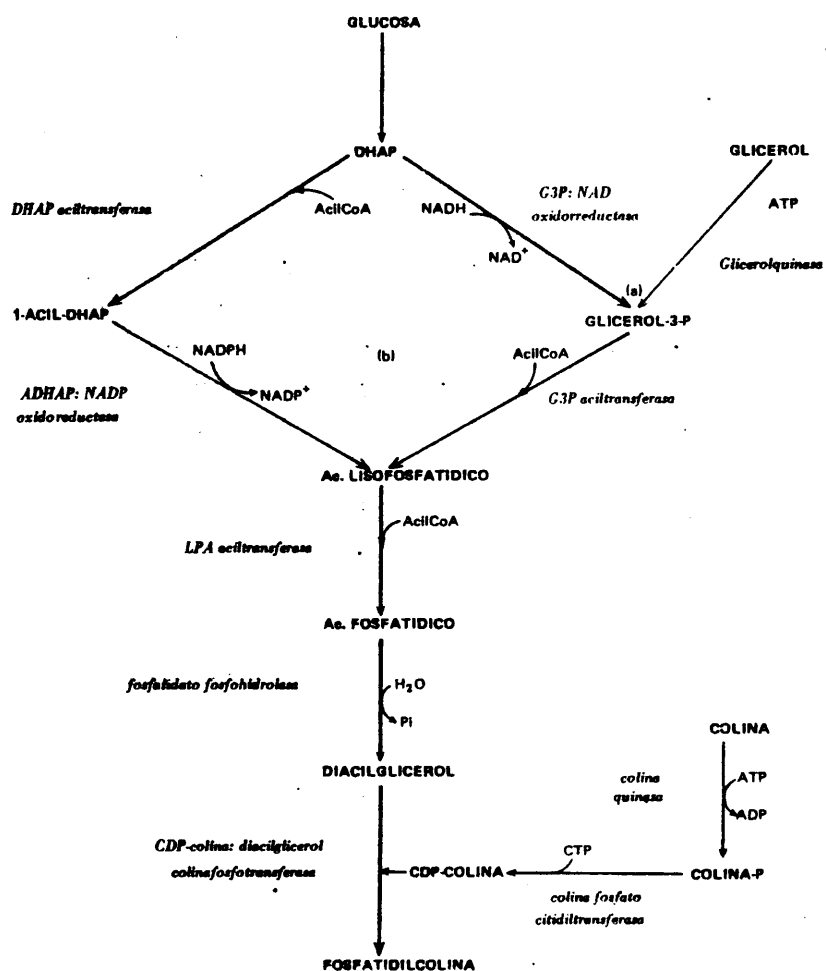


Fig. 6. Síntesis de novo de fosfatidilcolina. (a) Formación de Glicerol-3-P; (b) Formación de ácido lisofosfatídico.



- a) El  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato puede sintetizarse a partir de dos fuentes: Glucosa, suministrada por el torrente sanguíneo y glicerol. Los trabajos de Batemburg et al., (1978) y Smith y Kikkawa (1978) en cultivos celulares de pneumocitos tipo II, han demostrado que el  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato, esqueleto central de la fosfatidilcolina, se sintetiza preferentemente a partir de la glucosa vía dihidroxiacetona-3-fosfato (DHA-P). Ello confirma los resultados obtenidos por otros investigadores (Van Golde, 1976) y son consistentes con los niveles tan bajos de la actividad de *glicerol quinasa* encontrados en el tejido pulmonar por Scholz et al., (1972).
- b) Existen dos rutas alternativas para la síntesis del ácido lisofosfatídico (1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato): La reducción de la DHAP y posterior acilación del  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato (G3P) o la acilación de la DHAP y posterior reducción del intermedio 1-acil-dihidroxiacetona-3-fosfato (ADHAP). Esta segunda ruta fué descubierta en hígado por Agranoff y Hajra (1971) no siendo estudiada en pulmón hasta 1975 por Balint et al. Los resultados obtenidos en microsomas de pulmón por Fisher et al., (1976) y Sholossman y Bell, (1977), coinciden en que ambas rutas son operativas para la síntesis de ácido lisofosfatídico, asignando mayor importancia a la acilación del G3P. Por otra parte, los estudios realizados en cultivos de células tipo II por Mason (1978) ponen de manifiesto que el 64% de la fosfatidilcolina y el 56% del fosfatidilglicerol sintetizados en dichas células derivan de la ruta de acilación de la DHA-P y posterior reducción de ADHA-P.

Los datos de que se dispone hasta el momento, obtenidos en células tipo II aisladas o en todo el pulmón, permiten concluir, sin ninguna duda, que ambas rutas son operativas. Sin embargo, no se puede establecer que ruta es más significativa en el metabolismo lipídico pulmonar y en el de los pneumocitos tipo II en particular. Es posible que la funcionalidad de una u otra vía dependa de la disponibilidad de NAD y NADP y de su estado de oxidación.

- c) La formación del ácido fosfatídico se lleva a cabo por la acilación del 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato mediante el concurso de la actividad *1-acil G3P aciltransferasa*. Recientemente Yamada y Okuyama (1979) han estudiado la especificidad de esta enzima en fracción microsomal de hígado y pulmón, encontrando que los ácidos grasos insaturados se incorporan en la posición *sn*-2 del ácido fosfatídico a mayor velocidad que los saturados cuando se ensaya a concentraciones saturantes del ácido lisofosfatídico aceptor. Sin embargo, a concentraciones muy bajas del aceptor, concentraciones más parecidas a las que tendrían lugar *in vivo*, dicho sistema enzimático es altamente específico para acilCoA insaturados en hígado, mientras que en pulmón la especificidad para acilCoA insaturados es sólo ligeramente mayor que para los saturados. Estos resultados son de considerable interés en el estudio de la biosíntesis de la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en pulmón ya que hay que considerar que:

- La DPPC tiene un recambio muy rápido en el pulmón por lo tanto el intermedio 1-palmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfato debe encontrarse siempre a concentraciones muy bajas.

- El ácido palmítico es el ácido graso mayoritario de la biosíntesis de ácidos grasos en el pulmón.

En este sentido, los resultados de Yamada y Okuyama sugieren que al menos en situaciones de rápido recambio, como en estados de hiperventilación que inducen mayor secreción, la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina puede dar lugar a especies disaturadas, aunque no da cuenta de toda la DPPC producida.

- d) El ácido fosfatídico se hidroliza por la actividad *fosfatidato fosfolidrolasa* dando lugar a diacilglicerol, precursor de fosfolípidos (PC, PE, PS) y triglicéridos. Este sistema enzimático presenta una actividad específica muy elevada, lo que es consistente con la síntesis activa de fosfolípidos, especialmente de fosfatidilcolina en el pulmón (Mavis et al., 1978, Casola et al., 1978 y Spitzer y Johnston, 1978) y podría tener un papel regulador, limitante de la velocidad en la síntesis del surfactante pulmonar.
- e) Los trabajos realizados *in vitro* (Garzala y Van Golde, 1976; Engle et al., 1976 y Possmayer et al., 1977 y 1979) y en cultivos de células tipo II (Wykle et al., 1977 y Batenburg et al., 1978 y 1979) han puesto de manifiesto que la fosfatidilcolina formada por condensación de 1,2 diacilglicerol y CDP-colina presenta generalmente un ácido graso insaturado (oleico y linoleico) en la posición sn-2 y ácido palmítico en la posición sn-1. Ello sugiere la necesidad de una ruta auxiliar de síntesis de DPPC que implica el intercambio del ácido graso insaturado en la posición sn-2 por un ácido graso saturado.

La localización subcelular de las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de la fosfatidilcolina en el pulmón así como las referencias bibliográficas más recientes de cada una en particular, se expresan en el cuadro II. Ninguna de las enzimas estudiadas es única para este tejido.

CUADRO II

	RUTA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	LOCALIZACION	REFERENCIAS
Ruta común para fosfolípidos y triglicéridos	Formación de $\alpha$ -glicerol-3-P	<i>Glicerol quinasa</i> <i>G3P: NAD oxidoreductasa</i>	Microsomas Microsomas	Scholz et al. (1972) Smith y Kikkawa (1978) Batemburg et al. (1978)
	Formación de ácido lisofosfatídico	<i>G3P aciltransferasa</i> <i>DHAP aciltransferasa</i> <i>ADHAP: NADP oxidoreductasa</i>	Microsomas Microsomas Microsomas	Hendry y Possmayer (1974) Mason (1978) Sholossman y Bell (1977) Fisher et al. (1978) Balint et al. (1975)
	Formación de ácido fosfatídico diacilglicerol	<i>1-acil G3P aciltransferasa</i> <i>Fosfatidato fosfolidrolasa</i>	Microsomas Microsomas y Fr. soluble	Hendry y Possmayer (1974) Yamada y Okuyama (1979) Mavis et al. (1978) Spitzer y Johnston (1978) Casola et al. (1978)
Fosfatidilcolina de novo	Formación de fosfatidilcolinas saturadas e insaturadas	<i>Colina quinasa</i> <i>Colinafosfato citidiltransferasa</i> <i>Diacilglicerol: CDP-colina colinafosfotransferasa</i>	Fr. soluble Fr. soluble Microsomas	Oldenborg y Van Golde (1977) Rodney et al. (1978) Feldman et al. (1978) Engle et al. (1978, 1980) Possmayer et al. (1977) Wykle et al. (1977) Batemburg et al. (1978) Mason y Dobbs (1980)

### 1.3.2.2. Mecanismos de remodelación. Síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina.

En la figura 7 se representan los dos posibles mecanismos de remodelación de la fosfatidilcolina sintetizada *de novo*, esterificada en la posición *sn*-2 por un ácido graso insaturado. La fosfatidilcolina insaturada es desacilada por la enzima fosfolipasa  $A_2$ . La lisopalmitoil-PC resultante es utilizada como sustrato de dos sistemas enzimáticos:

- 1) *Lisolecitina aciltransferasa* (LAT) dependiente de CoA y ATP. (Mecanismo de reacilación).
- 2) *Lisolecitina: Lisolecitina aciltransferasa* (LLAT), no dependiente de CoA y ATP. (Mecanismo de transacilación).

Los dos mecanismos dan lugar a fosfatidilcolina disaturada. Ambas rutas son muy

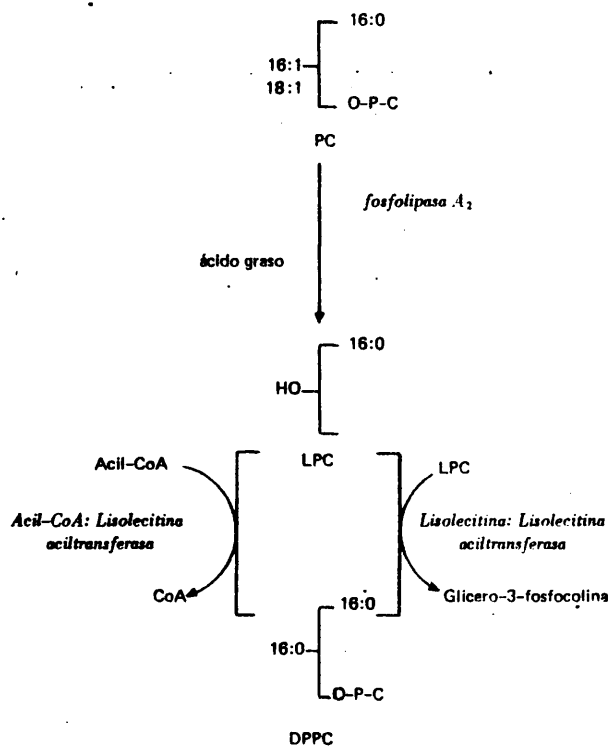


Fig. 7. Mecanismos de remodelación.

activas en pulmón pero no exclusivas de este órgano, aunque se ha demostrado que en otros tejidos como el adiposo o hepático tienen menor actividad.

Numerosos trabajos (Possmayer et al., 1977; Wykle et al., 1977; Engle et al., 1980; Mason y Dobbs, 1980) han demostrado la contribución de ambos mecanismos en la síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), ya que la ruta *de novo* es insuficiente para dar cuenta del rápido recambio de este fosfolípido en el pulmón.

Los mecanismos de remodelación se han estudiado durante la última década, en pulmón adulto (Cuadro III) y durante el desarrollo fetal (Cuadro IV) en experimentos con fracciones subcelulares, cortes de tejido, *in vivo* y muy recientemente con cultivos de células alveolares tipo II. Actualmente se está cuestionando qué ruta está implicada preferentemente en la biosíntesis de DPPC, así como la especificidad de los sistemas enzimáticos implicados frente a sustratos insaturados y saturados.

## CUADRO III

## MECANISMOS DE REMODELACION EN PULMON

SISTEMA ENZIMATICO	LOCALIZACION	REFERENCIAS
<i>Fosfolipasa A<sub>2</sub></i>	Microsomas	García et al. (1975) Longmore et al. (1979)
<i>Lisolecitina aciltransferasa</i> (L.A.T.) 1 <sup>ra</sup> referencia en hígado Lands, (1960)	Microsomas	Frosolono et al. (1971) Vereyken et al. (1972) Snyder y Malone (1975) Tansey y Frosolono (1975) Hasegawa-sasaki y Ohno (1975) Engle et al. (1976) Yamada y Okuyama (1979) Batemburg et al. (1979) Wykle et al. (1980) Mason y Dobbs (1980) Hayase et al. (1980) Holub et al. (1980)
<i>Lisolecitina: lisolecitina</i> <i>aciltransferasa</i> (LLAT) 1 <sup>ra</sup> referencia en hígado Erbland y Marinetti (1962)	Fr. Soluble	Van den Bosch (1965) Akino et al. (1971, 1972) Abe et al. (1972, 1973, 1974) Brumley et al. (1977) Viannen et al. (1978) Akino et al. (1978) Van Heusden y Van den Bosch (1979) Batemburg et al. (1979) Wykle et al. (1980) Mason y Dobbs (1980)
<i>Monoacilglicerol: CDP-colina</i> <i>colinafosfotransferasa</i> (formación de LPC)	Microsomas	Aarsman y Van den Bosch (1980)

#### 1.3.2.2.1. Fosfolipasa $A_1$ .

García et al., (1975) encontraron fosfolipasa  $A_1$  en microsomas de pulmón de rata. Posteriormente, los estudios se centraron en determinar la presencia o ausencia de dicha enzima en los cuerpos lamelares (García et al., 1976 y Heath y Jacobson, 1976). Recientemente, los trabajos de Longmore et al., (1979) demuestran que la fosfolipasa  $A_1$  sólo está presente en los microsomas de pulmón y estudian además su especificidad utilizando fosfatidilcolinas unidas a la membrana microsomal. Sus resultados son de gran importancia en la investigación del metabolismo de la fosfatidilcolina disaturada de mamífero:

- a) Existen dos conjuntos de fosfatidilcolinas en microsomas de pulmón. Uno conteniendo ácidos grasos sintetizados *de novo* (endógenos); por tanto comprende fosfatidilcolinas saturadas e insaturadas, susceptibles de ser hidrolizadas por fosfolipasa  $A_1$ .  
El otro, está formado a partir de ácido palmítico exógeno por lo que comprende fundamentalmente fosfatidilcolinas disaturadas formadas por la incorporación de palmitoil-CoA a 1 palmitoil-lisofosfatidilcolina, siendo no accesibles a la fosfolipasa  $A_1$ .
- b) La actividad de la enzima es más elevada para las fosfatidilcolinas conteniendo ácidos grasos insaturados en la posición *sn*-2.

El hecho de que sólo las fosfatidilcolinas sintetizadas *de novo* sean susceptibles de ataque por la fosfolipasa  $A_1$  puede ser debido simplemente a la localización de las actividades enzimáticas en la membrana microsomal (Fig. 9); y en este sentido Coleman, (1973) sugiere la importancia en las membranas biológicas de la localización de la relación y el carácter vectorial de esta.

Por otra parte, la mayor actividad de la enzima con fosfatidilcolinas insaturadas podría deberse a las propiedades físico-químicas del sustrato (mayor movilidad y permeabilidad en la membrana, al tener un ácido graso insaturado) más que a la especificidad de la enzima, es decir la difusión en la membrana de las fosfatidilcolinas saturadas es menor que el de las insaturadas.

Los trabajos de Longmore et al. resultan muy interesantes al estudiar la especificidad de la enzima con el sustrato unido a la membrana microsomal ya que el medio de reacción es más parecido al que tiene lugar *in vivo*. Ultimamente, algunos investigadores estudian la especificidad de sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo lipídico con sustratos unidos a membrana y sintetizados por la propia célula (Nanoh y Ohno, 1975, Casola et al., 1978).

#### 1.3.2.2.2. Especificidad de la actividad enzimática lisolecitina aciltransferasa.

Los estudios realizados *in vitro* por Holub et al., (1980) con microsomas de pulmón de

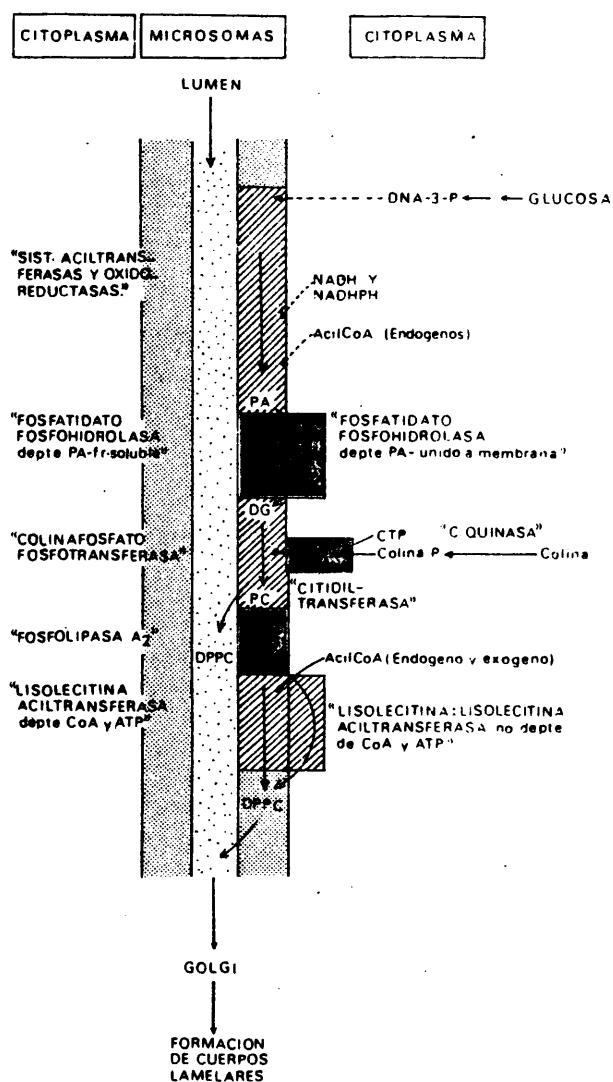


Fig. 8.— Síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina  
Localización subcelular de las actividades enzimáticas implicadas.



rata, ponen de manifiesto que, para todas las concentraciones ensayadas de aceptor de acilo (1-palmitoil o estearoil glicerofosforilcolina), la velocidad de reacción con distintos donadores de acilo (acil-CoA) es, en orden decreciente:

araquidonoil-CoA > linoleoil-CoA > oleoil-CoA > palmitoil-CoA > estearoil-CoA

Sin embargo, en cuanto al aceptor de acilo, la enzima muestra mayor preferencia para 1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina que para 1-estearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, a todas las concentraciones de acil-CoA estudiadas. De este modo, la especificidad de la enzima indica que puede dar lugar tanto a especies saturadas como insaturadas de fosfatidilcolina, lo que sugiere que este sistema enzimático no puede dar cuenta por sí sólo de la activa biosíntesis de DPPC en pulmón.

Los resultados de Holub et al. coinciden con los obtenidos por Yamada y Okuyama (1979) en microsomas de pulmón, no sólo en el hecho de la alta especificidad de la enzima por acil-CoA insaturados, sino también en que a concentraciones muy bajas del aceptor de acilo (1-palmitoil o estearoil-GPC) la actividad para linoleoil CoA es sólo 3-5 veces mayor que para palmitoil-CoA, comparado con la alta preferencia por linoleoil-CoA a concentraciones saturantes del aceptor. Yamada y Okuyama encontraron además, que la especificidad para acil-CoA es similar en hígado y pulmón cuando se trabaja a concentraciones saturantes de 1-acil-GPC. Sin embargo, a bajas concentraciones del aceptor, el sistema enzimático en hígado es totalmente específico para araquidonoil-CoA y linoleoil-CoA, quedando el ácido palmítico casi excluido de la posición *sn*-2.

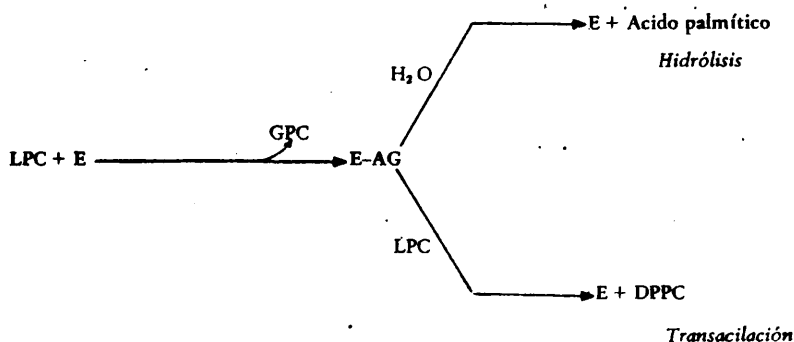
Por otra parte, Batenburg et al. (1979), trabajando con cultivos de células alveolares tipo II, estudiaron la especificidad de la enzima frente a palmitoil-CoA y oleoil-CoA observando una preferencia dos veces mayor por palmitoil-CoA que por oleoil-CoA. Estos resultados contrastan con los obtenidos por los autores anteriores en cuanto a la especificidad de la enzima incluso a concentraciones muy bajas del aceptor de acilo. La discrepancia de resultados en los dos sistemas *in vitro* podría ser debida a que las cantidades ensayadas de palmitoil-CoA y oleoil-CoA pudieran no ser equimoleculares, si consideramos los acil-CoA endógenos existentes en las células del cultivo.

De todos estos trabajos de investigación, se deduce que el método de estudio *in vitro* (fracciones subcelulares, cortes de tejido, cultivos celulares, etc.) así como las condiciones de ensayo (concentración de metabolitos, cationes, etc.) son factores determinantes en la interpretación de los resultados. En este sentido y en cuanto a la especificidad de la *Lisolecitina aciltransferasa* en pulmón, con los datos de que se dispone, sólo podemos admitir que si bien tiene mayor preferencia por acil-CoA insaturados que saturados, la especificidad que manifiesta por palmitoil-CoA a concentraciones bajas del aceptor de acilo (posiblemente a concentraciones fisiológicas) es significativamente mayor que para el sistema enzimático de hígado. Por otra parte su contribución a la síntesis de DPPC probablemente dependa de la disponibilidad de palmitoil-CoA en el citoplasma celular

#### 1.3.2.2.3. Especificidad y características de la actividad *Lisolecitina*: *Lisolecitina aciltransferasa*.

El mecanismo de transacilación se determinó por primera vez en fracción soluble de hígado por Erbland y Marinetti (1962) y de pulmón por Van den Bosch (1965) y consiste en la transferencia de acilo entre dos moléculas de 1-acil-*sn*-glicero-3-fosfolina para dar lugar a una molécula de 2-acil-*sn*-glicero-3-fosfolina y glicero-3-fosfolina (Fig. 7). Si bien en hígado este mecanismo es cuantitativamente despreciable, en pulmón es de extraordinaria importancia en la biosíntesis de dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina en animales adultos (Akino et al., 1971, 1972; Abe et al., 1973, 1974; Hallman et al., 1974; Brumley y Van den Bosch, 1977) y especialmente durante el desarrollo fetal (Oldenburg y Van Golde, 1976 y Hallman et al., 1975).

Los estudios realizados *in vitro* en pulmón de mamífero coinciden en que la actividad *lisolecitina*: *lisolecitina aciltransferasa* cataliza dos reacciones de forma paralela: a) transacilación entre dos *lisolecitinas*; b) hidrólisis del sustrato, lisofosfatidilcolina, dando lugar a glicero-3-fosfolina y al ácido graso que esterificaba la posición *sn*-1. En base a su bifuncionalidad Abe et al., (1974) y Brumley y Van den Bosch, (1977) han propuesto el siguiente mecanismo de reacción:



En contraste, en los experimentos realizados *in vivo* (Akino et al., 1971, 1972), con cortes de tejido pulmonar (Abe et al., 1973) y en cultivos de pneumocitos tipo II (Batemburg et al., 1979; Mason y Dobbs, 1980; Wykle et al., 1980) no se ha puesto de manifiesto aparentemente o al menos no se menciona la actividad de hidrólisis.

En cuanto a la especificidad de la enzima Vianen y Van den Bosch, (1978) han encontrado que:

- a) Como aceptor de acilo sólo son sustratos los lisofosfátidos y no glicerol, monoacilglicerol, glicerol-3-fosfato y glicerol-3-fosfocolina, lo que pone de manifiesto que la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* reconoce tanto la zona apolar de la molécula del sustrato como la zona polar y ambas son necesarias para la unión al centro activo de la enzima.
- b) Respecto al donador de acilo, la enzima muestra mayor preferencia por 1-palmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina que por 1-estearoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina.

#### 1.3.2.2.4. Contribución de ambos mecanismos en la síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina.

Los estudios realizados *in vitro* con fracciones subcelulares son contradictorios en cuanto a la determinación de la ruta predominante. Paralelamente, durante estos últimos años numerosos investigadores abordaron el problema con cultivos celulares de pneumocitos tipo II. Estos estudios lógicamente deberían aportar mayor información que los realizados con fracciones subcelulares de pulmón total ya que éste es un órgano heterogéneo compuesto por diferentes tipos de células y sólo las células alveolares tipo II biosintetizan y secretan el surfactante pulmonar. Sin embargo, tampoco en este caso se dispone de resultados coincidentes:

Los estudios de Mason y Dobbs, (1980) en cultivos celulares, ponen de manifiesto que el mecanismo de desacilación-reacilación es cuantitativamente más importante en la síntesis de DPPC, no siendo significativo el de desacilación-transacilación; sin embargo, estos autores no descartan la posibilidad de que la discrepancia entre sus resultados y los de otros autores trabajando con fracciones subcelulares se deba a las condiciones diferentes en los sistemas ensayados. En este sentido, habría que considerar que en el proceso de aislamiento de los pneumocitos tipo II podrían ser alteradas algunas rutas metabólicas a nivel de receptores de membrana (Finkelstein y Mavis, 1978) pudiendo incidir en la actividad *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa*. Además el sustrato, lisofosfatidilcolina, suministrado al medio de cultivo, puede ser acilado en la membrana plasmática y por tanto la cantidad de sustrato que entra en la célula y es accesible a la enzima es menor.

Por otra parte Batemburg et al., (1979) trabajando con cultivos de pneumocitos tipo II y Wykle et al., (1980) con adenoma alveolar tipo II observaron que la actividad *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* es mas baja que la actividad *lisolecitina aciltransferasa*; sin embargo no se puede establecer conclusiones definitivas respecto a la predominancia de uno u otro mecanismo. En este sentido, Wykle et al. sugieren que desde un punto de vista más fisiológico la contribución de ambos mecanismos en la síntesis de DPPC debe depender de los niveles y de la naturaleza de los precursores disponibles en las células, así como de la selectividad parcial de las aciltransferasas implicadas. De este modo, cuando la concentración de acil-CoA en la célula (suministrados a partir del torrente sanguíneo o sintetizados "de novo") sea fisiológicamente alta, el mecanismo predominante sería desacilación-reacilación, y a concentraciones bajas del precursor acil-CoA la

ruta más directamente implicada en la síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina sería la desacilación-transacilación.

### 1.3.3. Síntesis de fosfatidilglicerol.

La síntesis de fosfatidilglicerol en el pulmón tiene lugar por la ruta que se esquematiza en la figura 9 y al igual que en otros tejidos, en el retículo endoplasmático (Hallman y Gluck, 1975; Jelsema y More, 1978).

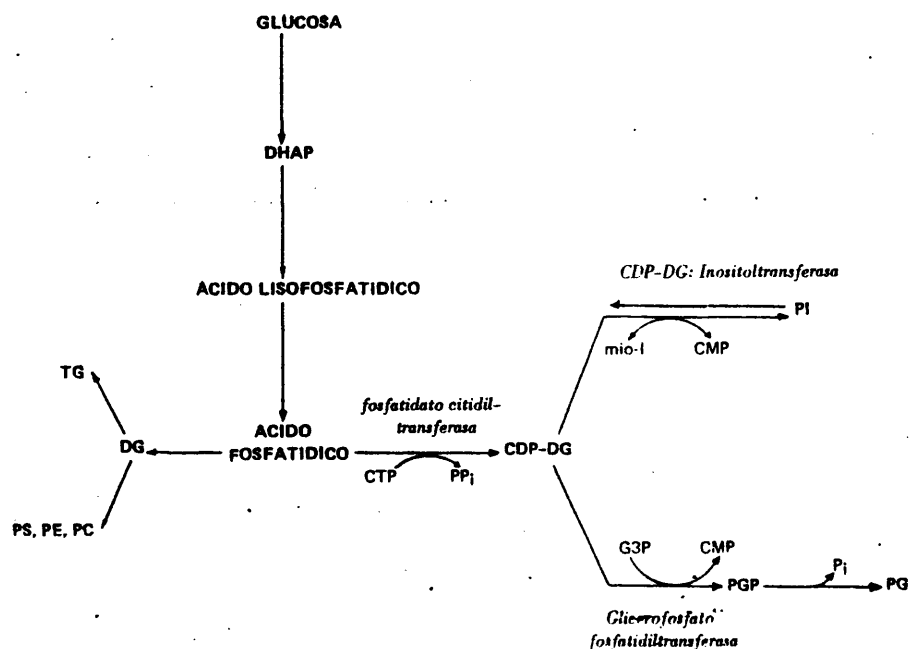


Fig. 9. Síntesis de fosfolípidos ácidos.

El ácido fosfatídico es un precursor común de fosfolípidos ácidos (PG y PI) y otros fosfolípidos (PC, PE, PS) y en este sentido no se han estudiado comparativamente las actividades de las enzimas *fosfatidato fosfolidrolasa* y *fosfatidato citidiltransferasa*.

Es interesante resaltar el hecho de que mientras el fosfatidilinositol se encuentra en todas las células de pulmón estudiadas (pneumocitos tipo I y II y macrófagos alveolares) en igual proporción, el fosfatidilglicerol está presente casi exclusivamente en las células alveolares tipo II (Smith y Yutaka, 1979). Los estudios realizados en los últimos años, respecto a su biosíntesis nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- a) El CDP-Diglicérido, intermedio común, puede condensarse con  $\alpha$ -glicerolfosfato (G3-P) o *mio*-inositol (*mio*-I) para dar lugar a PG y PI respectivamente. Se ha cuestionado si ambos fosfolípidos se sintetizan mediante el concurso del mismo sistema enzimático y en este sentido, recientemente Hallman y Epstein (1980) han puesto de manifiesto que las enzimas implicadas en la formación de PG y PI son distintas y se localizan en la membrana microsomal, lo que se demuestra por el hecho de que si bien la presencia de *mio*-inositol inhibe la *glicerolfosfato fosfatidiltransferasa*, la adición de un exceso de CDP-diacilglicerol hace desaparecer este efecto. Ello sugiere que la disminución de la actividad de esta enzima se produce por falta del sustrato (CDP-DG) más que por la competencia entre los precursores *mio*-inositol y  $\alpha$ -glicerolfosfato por un mismo sitio de la enzima. Además, Hallman y Epstein han encontrado que la actividad de la enzima *CDP-DG: inositol transferasa* es superior al de la enzima *glicerolfosfato fosfatidiltransferasa* lo que es consistente con la disminución de la actividad de esta última al aumentar la concentración de *mio*-inositol.
- b) La disponibilidad de CDP-DG es el factor limitante de velocidad en la síntesis de fosfatidilglicerol. En este sentido, Bleasdale et al., (1979) proponen que el PI presente en las células alveolares tipo II puede ser una fuente de CDP-DG para la biosíntesis de PG, componente fundamental del surfactante pulmonar. Esta hipótesis está apoyada por la reversibilidad de la reacción de la *CDP-DG: inositol transferasa*, de manera que cuando los niveles de CMP aumentan en la célula la reacción revierte hacia la formación del CDP-DG, precursor del fosfatidilglicerol y por el estudio de la variación de los niveles de PI y PG durante la ontogenia (Hallman et al., 1976) que pone de manifiesto que el aumento de los niveles de PG al final del desarrollo fetal es paralelo al decrecimiento de los niveles de PI.
- c) Con respecto a las especies moleculares de fosfatidilglicerol, Mason y Dobbs (1980) han encontrado que en las células alveolares tipo II las especies saturadas de este fosfolípido son predominantes sobre las insaturadas.

#### 1.3.4. Síntesis del surfactante pulmonar durante el desarrollo fetal y periodo postnatal.

El pulmón es un órgano inmaduro hasta prácticamente el término de la gestación. La aparición histológica típica del pulmón maduro coincide con la acumulación de cuerpos lamelares en las células alveolares tipo II (Funkhouser y Hughes, 1978) y con un aumento de los niveles de

dipalmitoilfosfatidilcolina y fosfatidilglicerol, así como de una disminución substancial de esfingomielina, en el lavado pulmonar.

Un gran número de hormonas (glucocorticoides, estrógenos, tiroxina), agentes neurohumorales, AMP cíclico, así como el stress y el parto estimulan la producción del surfactante en la última etapa del desarrollo fetal. Los glucocorticoides (Rooney et al., 1979) y estrógenos (Khosla et al., 1980) en particular, estimulan la síntesis del surfactante mientras que los otros se cree que inducen su secreción. Recientemente, Marino y Rooney (1980) han puesto de manifiesto en pulmón fetal de conejo, que poco antes del nacimiento la liberación del surfactante se realiza de forma gradual y es prácticamente lineal y dependiente de la temperatura en el primer día del periodo postnatal. Además, han observado que la secreción se estimula por prostaglandina  $E_2$  y  $Ca^{2+}$ , siendo este hecho de gran importancia ya que se ha demostrado que las prostaglandinas están implicadas en el parto (Nathanielsz, 1978) y que el parto induce la secreción de surfactante (Rooney et al., 1977a). Por otra parte, Powell y Solomon (1978) han encontrado que la síntesis de prostaglandina  $E_2$  en pulmón fetal incrementa con la edad gestacional y las células alveolares tipo II sintetizan preferentemente prostaglandina  $E_2$  (Taylor et al., 1979).

El estudio de la biosíntesis lipídica y de los mecanismos de secreción del surfactante en la última etapa de la gestación, etapa crítica del desarrollo fetal, constituye en la actualidad un aspecto de gran interés ya que de una correcta actividad biosintética y secretora dependerá la funcionalidad normal del pulmón y por tanto la supervivencia del organismo. En este sentido, se ha comprobado que en el síndrome de disfunción respiratoria del neonato y en la enfermedad de la membrana hialina existe una concentración muy baja del material tensoactivo en el fluido alveolar. Estos estados patológicos se manifiestan con mayor incidencia en partos prematuros y en nacimientos por cesárea realizados antes de las contracciones uterinas, siendo la causa principal de mortalidad neonatal.

#### *1.3.4.1. Variación de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de lípidos. Efecto de los corticoides*

En los cuadros IV y V se esquematiza la variación de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol, respectivamente, así como el efecto de los corticoides.

Respecto a la síntesis de fosfatidilcolina se puede observar no sólo la diferencia de resultados, en algunos casos, según la especie estudiada, sino también la controversia existente entre algunos autores trabajando en la misma especie. No obstante, los resultados obtenidos por distintos investigadores coinciden en que dos actividades enzimáticas aumentan de manera significativa durante la última etapa del desarrollo fetal.

a) *Fosfatidato fosfohidrolasa*. El aumento de actividad trae consigo el incremento de los niveles

de diacilglicerol, precursor de la síntesis de fosfatidilcolina. En este sentido, el aumento de la actividad de los enzimas de la ruta CDP-colina, observado por algunos autores, puede ser debido simplemente al aumento de la concentración de sustrato. De esta forma, la actividad *fosfatidato fosfohidrolasa* se constituye como una enzima reguladora ya que controla los niveles de diglicéridos. Esta aseveración se apoya en el hecho de que dicha actividad se estimula en la última etapa del desarrollo fetal posiblemente por corticoides endógenos y experimentalmente por corticoides exógenos.

- b) *Lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa*. En las primeras etapas del desarrollo la actividad de esta enzima es mucho más baja que la de *colina fosfotransferasa* lo que podría indicar que en este periodo opera fundamentalmente la ruta *de novo*. Sin embargo, en la última etapa del desarrollo la actividad *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* aumenta paralelamente con la disminución de la actividad *colinafosfotransferasa* lo que sugiere que en el término de la gestación el mecanismo de transacilación es de gran importancia en la formación y en el mantenimiento de los niveles de dipalmitoilfosfatidilcolina. Además, la administración de glucocorticoides también estimula dicha actividad.

Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento con corticoides durante la gestación da lugar a cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que implican una aceleración de la maduración pulmonar. En este sentido, la incidencia del síndrome de disfunción respiratoria es substancialmente reducido por la administración de betametasona, un corticoide sintético, a mujeres con parto prematuro. Sin embargo, la efectividad del tratamiento sólo se observa en aquellos casos en los que la administración de la hormona se efectúa al menos 24 horas antes del parto. La cuestión que se ha planteado durante estos últimos años es cuál es el mecanismo bioquímico por el que los corticoides inducen la maduración pulmonar y por otra parte cuál es la dosis farmacológica adecuada para su utilización en la prevención y tratamiento del síndrome de disfunción respiratoria ya que dosis no fisiológicas desencadenan efectos adversos (Possmayer et al., 1979), siendo el más destacado la inhibición del crecimiento pulmonar y cerebral, en fetos, debido a la disminución de la mitosis celular.

El efecto de los corticoides posiblemente implica la estimulación de enzimas, mediada por receptores de glucocorticoides. En este sentido, Ballard y Ballard, (1974) han demostrado que estos receptores se encuentran en el pulmón fetal en mayor cantidad por unidad de masa que en ningún otro órgano estudiado.

La identificación de los sistemas enzimáticos estimulados por corticoides, ha sido un objetivo difícil y todavía cuestionable. Todos los estudios que abordan este tema (Cuadro IV) están de acuerdo en que el efecto estimulante de los corticoides sólo incide sobre la actividad *fosfatidato fosfohidrolasa* en el comienzo de la maduración pulmonar y sobre las enzimas implicadas en los mecanismos de remodelación, casi en el término de la gestación. Estos hechos ponen de manifiesto que la administración de corticoides va a incidir sobre las enzimas que

normalmente incrementan su actividad en la última etapa del desarrollo fetal, probablemente como consecuencia de la elevación de los niveles del cortisol materno durante la última fase de la gestación.

Respecto al fosfatidilglicerol se ha demostrado que su síntesis tiene lugar justo antes del nacimiento y durante el periodo perinatal (Longmuir y Johnston, 1980; Hallman y Gluck, 1976). Además, Hallman et al., (1976) encontraron que durante el último trimestre de gestación en humanos, el surfactante aislado del líquido amniótico contiene fundamentalmente fosfatidilinositol, en lo que se refiere a los glicerofosfolípidos ácidos, y sólo en las últimas semanas de la gestación empieza a aumentar la proporción de fosfatidilglicerol a la vez que disminuye la de fosfatidilinositol.

La presencia de fosfatidilglicerol en el surfactante es un índice de la maduración pulmonar. En este sentido, numerosos autores (Hallman et al., 1977; Cunningham et al., 1978; Tsai y Marshall, 1979) han puesto de manifiesto que los niños recién nacidos con deficiencia de este fosfolípido en el complejo tensoactivo, tienen una probabilidad mayor de que se manifieste el síndrome de disfunción respiratoria cuyos síntomas no aparecen generalmente hasta algunas horas después del nacimiento.

La única enzima de las implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos ácidos cuya actividad aumenta al final del desarrollo fetal es la CTP: fosfatidato citidiltransferasa (Cuadro V). Longmuir y Johnston (1980) han observado que la actividad específica de esta enzima permanece constante entre los días 23 y 28 del desarrollo fetal del conejo. A partir del día 29 (dos días antes del término) empieza a aumentar, alcanzando un valor máximo el primer día del periodo postnatal y mantiene este valor en los días posteriores. Asimismo, estudiaron comparativamente dicha enzima en fracción microsomal de hígado indicando que permanece constante a lo largo del desarrollo y sólo aumenta ligeramente en el periodo postnatal, manifestando en todo momento una actividad específica sustancialmente inferior a la del pulmón.

Es un hecho evidente que las dos enzimas claves para la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina y de fosfatidilglicerol, que utilizan ambas en mismo sustrato (ácido fosfatídico), aumentan su actividad en la última etapa del desarrollo fetal. La actividad fosfatidato fosfohidrolasa se incrementa unos días antes que la CTP: fosfatidato citidiltransferasa lo que está de acuerdo con la aparición cronológica de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol en los cuerpos lamelares del pulmón fetal y en el lavado alveolar.

Respecto a la estimulación por corticoides sólo se ha estudiado sobre la actividad glicerofosfato fosfatidiltransferasa. Los resultados son contradictorios y algunos no concuerdan con el hecho de que la actividad de la enzima permanece constante a lo largo del desarrollo.



CUADRO IV

SINTESIS DE FOSFATIDILCOLINA

RUTA		A. ENZIMATICAS	VARIACION DURANTE EL DESARROLLO FETAL	REFERENCIAS	EFFECTO DE LOS CORTICOIDES	REFERENCIAS
PA	DE NOVO	Fosfatidato Fosfolipidos	Empieza a incrementar de 4-8 veces 5 días antes del término (conejo) Se observa dicha actividad en el líquido amniótico La actividad sobrepasa los niveles del adulto después del nacimiento hasta el día 20 del período postnatal (rata)	Schultz et al. (1974) Jiménez et al. (1978) Rao Revichandral et al. (1978)	Aumenta la actividad 5 días antes del término (conejo) La actividad en fr. soluble es mayor que en fracción micelar	Possneyer et al. (1977) y (1978) Brehler et al. (1977) Rooney et al. (1978)
		Culinas quinas	No varía a lo largo del desarrollo (rata) (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1977) Rooney et al. (1978a)	No estimulan la actividad (rata) (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1977) Rooney et al. (1978b)
PC		CTP, Colina, P citidiltransferasa	Aumenta dos días antes del término, alcanzando el valor máximo un día antes del nacimiento (rata) Solo aumenta después del nacimiento (conejo)	Stern et al. (1978) Oldenberg y Van Golde (1977) Rooney et al. (1978a)	No estimulan la actividad (rata) (conejo) Aumenta la actividad (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1977) Farrell y Zachman (1973) Rooney et al. (1978)
		Disclitico: CTP-citina Colina/Colina- transferasa	Incrementa dos días antes del término, disminuyendo dos días después del nacimiento hasta alcanzar un valor mínimo (rata) Solo aumenta después del nacimiento (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1978) y (1977) Rooney et al. (1978a)	Aumenta la actividad (rata) Estimulación no significativa (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1977) Possneyer et al. (1977) y (1978) Brehler et al. (1977) Rooney et al. (1978b)
DESACILACION - REACILACION		Acil CoA: Lipidasa Aciltransferasa	No varía a lo largo del desarrollo (rata) (conejo) Aumenta la actividad al término (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1978) Rooney et al. (1978a) Tsao y Zachman (1977)	No aumenta la actividad (conejo) Estimulación (conejo) (rata)	Rooney et al. (1978) Possneyer et al. (1978) Oldenberg y Van Golde (1977)
		Lipidolisis: Lipidasa Aciltransferasa	Aumenta significativamente en la última etapa del desarrollo fetal, alcanzando valores máximos 1 día antes del término y al primer día del período postnatal (rata) (conejo)	Oldenberg y Van Golde (1978) Oldenberg y Aikino (1978) Tsao y Zachman (1977)	Incrementa muy significativamente (conejo) (rata)	Possneyer et al. (1978) Oldenberg y Van Golde (1977)

CUADRO V

SINTESIS DE FOSFATIDILGLICEROL

A. ENZIMATICAS	LOCALIZACION	VARIACION DURANTE EL DESARROLLO FETAL	REFERENCIAS	EFFECTO DE LOS CORTICOIDES	REFERENCIAS
CTP: Fosfatidato citidiltransferasa.	MICROSOMAS	Incrementa dos días antes del término, alcanzando el máximo el primer día post-natal. (Conejo)	Longmair y Johnston (1980) Hellman y Gluck (1975)	No estudiado	—
Glicerofosfato Fosfatidiltransferasa.	MICROSOMAS	No varía a lo largo del desarrollo fetal (Conejo)	Rooney et al. (1976a)	Incrementa el día 26 de gestación (5 días antes del término) (Conejo). No aumenta significativamente (Conejo).	Rooney et al. (1975) Possmayer et al. (1979) Brehier et al. (1977)

### 1.3.5. Influencia de los factores ambientales en la síntesis del surfactante pulmonar: Nutrición y Temperatura

Kynakides et al., (1976) estudiaron las alteraciones producidas por una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales en las distintas especies moleculares de fosfatidilcolina de hígado y pulmón, llegando a las siguientes conclusiones:

- Existe una diferencia esencial respecto a las alteraciones producidas en ambos tejidos: mientras que en pulmón la deficiencia de ácidos grasos esenciales induce la reducción del contenido en ácido palmítico y por tanto de fosfatidilcolinas saturadas, en el hígado tiene lugar una disminución de las especies insaturadas a favor de las saturadas.
- El contenido total de fosfatidilcolina en el tejido pulmonar y lavado alveolar no varía en animales alimentados con esta dieta y sin embargo, la proporción de fosfatidilcolinas saturadas y especialmente de DPPC disminuye considerablemente lo que incide en las propiedades tensoactivas del surfactante pulmonar.
- Las alteraciones producidas por dietas deficientes en ácidos grasos esenciales revierten totalmente al cabo de siete días de administración de una dieta conteniendo ácido linoleico, aunque carezca absolutamente de cualquier tipo de grasas.

Recientemente Nakamura et al., (1980) confirman los resultados de los autores anteriores y además estudian a nivel metabólico los efectos de esta dieta en la biosíntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina en pulmón. En este sentido, demostraron que ninguna de las enzimas implicadas en la síntesis de fosfolípidos se ve afectada por este estado fisiológico. Sin embargo, la incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato y  $^{14}\text{C}$ -palmitato en fosfatidilcolinas disaturadas decrece significativamente. Ello se debe fundamentalmente a dos hechos:

- a) La disminución de la utilización de palmitato exógeno ya que han observado que el ácido linoleico facilita la entrada del ácido palmítico procedente del torrente sanguíneo, en las células pulmonares. Posiblemente el ácido linoleico confiera a las membranas celulares mayor movilidad y permeabilidad.
- b) La disminución de la síntesis de palmitato en las células del pulmón. En este sentido, se ha demostrado que si bien este estado fisiológico no afecta a la capacidad de síntesis *de novo* de ácidos grasos, si altera su composición ya que se produce mayor cantidad de oleato que en condiciones normales.

Por otra parte, otros investigadores (Gail et al., 1977) han estudiado el efecto del ayuno prolongado en el contenido de fosfatidilcolina en el lavado pulmonar y en todo el tejido,

encontrándose que los niveles disminuyen considerablemente. Ello puede ser debido a la disminución de la velocidad de síntesis de lípidos ya que es un hecho conocido que la actividad de varias enzimas implicadas en la síntesis de fosfolípidos y ácidos grasos disminuyen en este estado fisiológico. Sin embargo, han observado que la composición del surfactante permanece invariable.

La influencia de la nutrición es aun más interesante, desde un punto de vista clínico, durante el desarrollo fetal y periodo postnatal. En este sentido, Faridy (1975) ha demostrado que la nutrición de la rata gestante incide en la biosíntesis de fosfatidilcolina en el pulmón fetal. Con frecuencia la incidencia del síndrome de disfunción respiratoria es mayor en niños que nacen de madres diabéticas o en animales de madres hipofisectomizadas cuyos sistemas de síntesis de ácidos grasos están alterados. Por otra parte Cross et al., (1978) estudiaron el efecto de la desnutrición en el conejo recién nacido observando que no se produce ninguna variación en el contenido del surfactante pulmonar y Mims y Pascale (1979) investigaron las consecuencias no sólo del ayuno sino también del frío prolongado, en el contenido de fosfolípidos totales, fosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilcolina en pulmón de conejo recién nacido indicando que se movilizan los ácidos grasos de las reservas de tejido adiposo para la producción de calor y disminuye el contenido de triglicéridos pulmonares lo que sugiere que los ácidos grasos y lípidos circulantes están prácticamente agotados y por tanto el suministro exógeno para la síntesis de fosfolípidos pulmonares. Sin embargo, aunque se observa una disminución significativa de PL totales y PC, no se detecta ninguna alteración en el contenido de DPPC ni en las características funcionales presión-volumen del pulmón. Por tanto podemos concluir que en el periodo postnatal la composición del complejo tensoactivo se mantiene, aún en las condiciones más adversas quizás a expensas de otros fosfolípidos estructurales. En este sentido, es posible que los niños prematuros con poco peso y pocas reservas de grasas e hidratos de carbono, y dado que el hígado es inmaduro hasta el término de la gestación, sufran un *stress* ambiental durante las primeras horas de adaptación debido a la falta de suministro energético a partir de la placenta y a la baja temperatura ambiental, manteniéndose sin embargo, el complejo tensoactivo en el cual se basa su supervivencia.

# OBJETIVO DE LA PRESENTE INVESTIGACION

La información precedente pone de manifiesto la importancia, para el funcionamiento normal del pulmón, de la biosíntesis y secreción del fosfolípido *dipalmitoilfosfatidilcolina*. De hecho, se ha comprobado que, en determinados estados patológicos como atelectasis alveolar, cianosis, edemas pulmonares y sobre todo en el síndrome de disfunción respiratoria del neonato existe una deficiencia muy evidente en los niveles de dicha especie molecular.

El estudio de los mecanismos de biosíntesis de la *dipalmitoilfosfatidilcolina* en adultos y durante el desarrollo fetal constituye en la actualidad un aspecto de gran interés y de marcada proyección fisiopatológica. En este sentido, el conocimiento detallado de las rutas biosintéticas del material tensoactivo, la caracterización de los sistemas enzimáticos implicados y su regulación, va a hacer posible, en un futuro, la interpretación a nivel molecular de estados patológicos relacionados con la deficiencia del surfactante pulmonar. Todo ello unido a los numerosos estudios realizados en este Departamento sobre la composición de fosfolípidos pulmonares (a), su biosíntesis en microsomas de pulmón de conejo (b), *in vivo* en condiciones normales (c) y en condiciones de shock séptico e hipovolémico (d), nos ha llevado a abordar el estudio del sistema enzimático *Lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa*, que está directamente implicado en la síntesis de *dipalmitoilfosfatidilcolina*, especialmente en condiciones de baja energía celular como en las células fetales de pulmón.

Esta investigación cifra su interés en el aislamiento y purificación de esta proteína a fin de aportar una información relativa a sus características enzimáticas (influencia de factores como pH, fuerza iónica, temperatura, etc.), su comportamiento cinético (mecanismo de reacción), su especificidad frente a sustrato (respecto a la zona polar y apolar del mismo), así como la influencia de diferentes lípidos en la actividad enzimática. Por otra parte, se analizará de manera especial la influencia de la naturaleza físico-química del sustrato en la formación de los productos finales de la reacción, ya que se trata de un lípido anfipático soluble que está presente en solución en forma de monómeros y micelas, hecho que incide en los parámetros cinéticos y en las curvas de  $v$  vs  $E$ . Además, se estudiarán que factores modifican la reacción hidrólisis/transacilación y se discutirá el papel fisiológico de esta enzima y su importancia en la biosíntesis del surfactante pulmonar.

- 
- (a) Acebal, C., Castro, J., Arche, R. y Municio, A.M. (1974) *Steroids Lipid Res.* 5, 65; (1974) *Ibid* 5, 143; (1974) *Ibid* 5, 209.
  - (b) Acebal, C., Arche, R., Casals, C., Castro, J. y Rodríguez, S. (1979) *Int. J. Biochem.* 10, 463.
  - (c) Acebal, C., Arche, R., Castro, J., García-Barreno, P. y Municio, A.M. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 537.
  - (d) Balibrea, J.L., García-Barreno, B., García-Barreno, P. y Municio, A.M. (1979) *Int. J. Biochem.* 10, 91.

## II MATERIALES Y METODOS

### II.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los pulmones de conejo utilizados a lo largo de este trabajo se han obtenido en un matadero industrial. Después de sacrificar el animal, los pulmones se extrajeron rápidamente y se congelaron en aire líquido, manteniéndolos posteriormente a  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### II.2. PREPARACION DE SUSTRATOS

1-(1- $^{14}\text{C}$ ) Palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina ( $0.05 \mu\text{ci}/\mu\text{mol}$ ) se prepara a partir de  $^{14}\text{C}$ -LPC de actividad específica 59 mci/mmol (Amersham Radiochemical Center, Inglaterra) y LPC fría obtenida a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina (Sigma Chemical Co.). Asimismo, todos los análogos de sustrato no radioactivos se obtienen a partir del correspondiente fosfolípido por hidrólisis enzimática con *fosfolipasa A<sub>2</sub>*.

#### II.2.1. Hidrólisis de Fosfolípidos

La hidrólisis de fosfatidilcolina y de otros fosfolípidos se lleva a cabo con veneno de *Crótalus Adamanteus* (Sigma Chemical Co.) que contiene *fosfolipasa A<sub>2</sub>*, previamente deslipidizada con éter:

Se añade el fosfolípido disuelto en éter ( $0.4 \text{ ml/mgr PL}$ ) a una mezcla de veneno de C.A.,  $\text{CaCl}_2$  5mM y tampón borato 0.1 M,  $\text{PH} = 7.2$ , en las proporciones siguientes: 2.5 mgr, 0.2 ml y 0.2 ml. respectivamente por cada 10 mgr. de fosfolípido. La mezcla se incuba con agitación (agitador incubador NBS Gyrotory) durante 3 horas a  $29^{\circ}\text{C}$ , al cabo de las cuales se detiene la reacción por adición de metanol ( $0.2 \text{ ml./mgr. PL}$ ). La proteína se elimina por filtración a través de una placa de vidrio sinterizado (poro 4) y el filtrado se lleva a sequedad en un evaporador rotatorio tras sucesivas adiciones de metanol.

Para separar los productos de reacción, ácidos grasos y lisofosfolípidos, se añade 50 ml. de éter al residuo sólido y la suspensión se deja enfriar durante 20 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los lisofosfolípidos precipitan en éter frío por su mayor polaridad y se separan por centrifugación durante 10 minutos a  $12.000 \times g$  en una centrífuga Sorvall RC2B a  $0-2^{\circ}\text{C}$ . El sedimento se lava dos veces con éter frío, obteniendo rendimientos superiores al 95%.

### II.2.2. Criterios de pureza

#### a) Cromatografía en capa fina:

Se lleva a cabo para controlar la pureza de la LPC y otros lisofosfolípidos aislados, así como el rendimiento de la hidrólisis. Se aplican el sustrato, el producto de la hidrólisis y la LPC aislada por precipitación en éter frío, en placas de silicagel-G (SGG-Keissegel-G, Merck) de 20 x 20 cm. y 0.5 mm. de espesor, previamente activadas a 110°C durante 1 hora. La cromatografía se desarrolla en el sistema cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v) y se revela con vapores de yodo. (Figura 10).

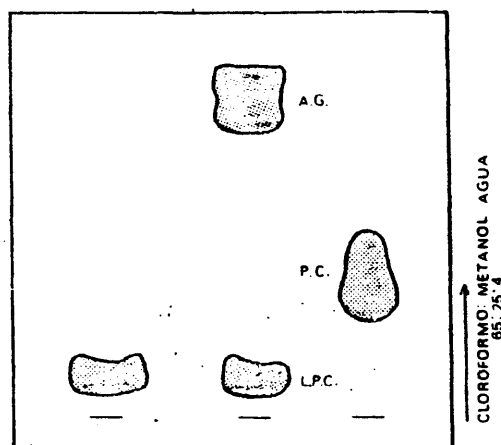


Fig. 10.— Cromatografía monodimensional para separar los productos de la hidrólisis de fosfolípidos.

#### b) Cromatografía de gases

El análisis de ácidos grasos de los lisofosfolípidos se lleva a cabo por esta técnica cromatográfica. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos preparados de acuerdo con el método de Metcalfe y Schmitz (1961), se extraen con hexano y se analizan en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas

rellenas de succinato de dietilenglicol al 15% sobre Cromosorb. La identidad de los picos y validez cuantitativa de las concentraciones calculadas para los ácidos grasos se establecen por comparación con patrones de ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

### II.2.3. Determinación cuantitativa de Fosfolípidos

Se lleva a cabo por el método de Rouser et al. (1966):

Las muestras de fosfolípidos se transfieren a matraces Kjeldal a los que se adicionan 0.9 ml. de ácido perclórico al 70% una vez que se ha eliminado todo resto de disolvente orgánico. Los matraces se introducen en un baño de arena a 250-260°C durante 25 minutos dejándolos enfriar a continuación a temperatura ambiente. Para la valoración colorimétrica del fósforo se añaden 7 ml. de agua destilada, 1 ml. de solución de molibdato amónico al 2.5% y 1 ml. de ácido ascórbico al 10%. El conjunto se calienta durante 7 minutos en un baño de agua hirviendo, al cabo de los cuales la reacción se detiene por inmersión de los matraces en hielo. El molibdato amónico forma un complejo con el fósforo que se reduce por el ácido ascórbico dando lugar a un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 820 nm. La lectura de absorbancias se lleva a cabo en un colorímetro Coleman Junior II, modelo 6/20 y los  $\mu\text{gr}$  de fósforo se determinan mediante una curva patrón de fosfato inorgánico, siendo el método sensible entre 1 y 8  $\mu\text{gr}$ . de fósforo por muestra.

### II.2.4. Síntesis enzimática de 1-(9-10<sup>3</sup> H)-palmitoil-sn-glicero-3 fosfoetanolamina

Debido a la no disponibilidad comercial de PE y LPE tritiadas se prepararon enzimáticamente para estudios de especificidad de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* y de competencia entre sustratos.

Para la síntesis de di-(9-10<sup>3</sup> H)-palmitoil fosfatiletanolamina se utilizó como preparado enzimático el sobrenadante postmitocondrial de hígado y/o cerebro aislado mediante centrifugación diferencial (según se describe en el apartado II.4.1) y se incubó durante 1 hora a 37°C en un medio de la siguiente composición:

Mg Cl<sub>2</sub> 0.4 mM, ATP 0.4 mM, CoA 0.12 mM,  
ácido (9-10<sup>3</sup> H)-palmitico (154 ci/mol) 0.06 mM  
suspendido previamente en CO<sub>2</sub> H K mediante sonicación,  
50 mgr. de proteína y tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.2  
en un volumen final de 30 ml.

La reacción se detuvo por adición de cloroformo/metanol (2:1, v/v) y los lípidos se



extrajeron por el método de Bligh y Dyer, (1959). Los lípidos totales aislados se fraccionaron en sus distintas clases de fosfolípidos por cromatografía en capa fina monodimensional, utilizando el sistema cloroformo/metanol/amoniaco 7M (90:54:11, v/v/v). El revelado se lleva a cabo con el reactivo Dittmer (Dittmer 1964) en los laterales de la aplicación principal, donde hay controles aplicados (Figura 11) y la mancha correspondiente a la fosfatidiletanolamina se raspa y se eluye de la silicagel mediante extracciones sucesivas con cloroformo/metanol (2:1, 1:1 y 1:9, v/v) y metanol puro. La silicagel se separa de la fase orgánica por filtración en placa de vidrio sinterizado (poro 4). El filtrado se lleva a sequedad en el rotavapor y el residuo seco se lava con cloroformo para eliminar totalmente los restos de silicagel-G.

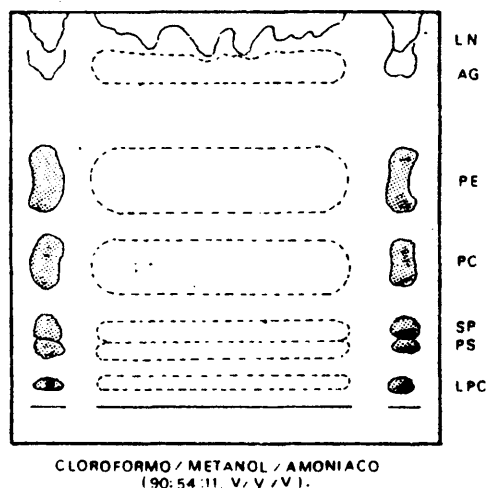


Fig. 11. Separación de lípidos polares por cromatografía unidimensional.

La  $^3\text{H}$ -PE aislada se sometió a hidrólisis enzimática de acuerdo con el método descrito en el apartado II.2.1., obteniéndose el lisoderivado correspondiente. Mediante cromatografía de gases se comprobó que la  $^3\text{H}$ -LPE sintetizada tiene ácido palmítico en mayor proporción y algo de ácido esteárico estando casi excluidos de su composición los ácidos grasos insaturados.

El cálculo de la actividad específica de la  $^3\text{H}$ -LPE se llevó a cabo por análisis cuantitativo de fósforo (II.2.3) y conteo de la radioactividad incorporada por centelleo líquido, utilizando como sistema de centelleo: naftaleno 150 gr.; PPO 10.5 gr.; POPOP 0.45 gr.; dioxano hasta completar 1.500 ml. y 300 ml. de agua destilada. Las medidas se efectuaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3255, con estándar externo para el cálculo de la eficiencia del conteo.

La actividad específica de la  $^3\text{H}$ -LPE aislada, fue de 4.55 mci/mmol y fue convenientemente diluida a 0.2  $\mu\text{ci}/\mu\text{mol}$  con LPE fría obtenida a partir de dipalmitoilfosfatidiletanolamina.

### II.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

#### a) Ensayo enzimático

Las actividades *lisolecitina acilhidrolasa* y *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de la enzima se ensayaron simultáneamente en el mismo medio de incubación que contiene 0.4  $\mu\text{moles}$  de 1-(1- $^{14}\text{C}$ )-palmitoil-sn-glicero-3- fosfocolina (actividad específica 0.05  $\mu\text{ci}/\mu\text{mol}$ ) suspendidos en 0.5 ml. de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.5 mediante sonicación durante 30 segundos, en un sonicador MSE. La reacción se inicia añadiendo 0.5 ml. del preparado enzimático, de concentración variable. La mezcla de incubación se agita a 37°C en baño de agua durante 5 minutos, deteniéndose la reacción al cabo de este tiempo por adición de 5 ml. de cloroformo-metanol (2:1, v/v).

#### b) Identificación de los productos de reacción

La extracción de los lípidos se realiza por la adición dos veces consecutivas de 5 ml. de cloroformo-metanol (2:1, v/v), agitándose la mezcla por vibración durante 1 minuto y extrayéndose a continuación la fase clorofórmica. Los extractos clorofórmicos reunidos se lavan con 0.25 ml. de KCl 0.1 M y la fase clorofórmica, una vez extraída, se lleva a sequedad en un rotavapor a temperatura no superior a 40°C.

La separación de los lípidos se lleva a cabo por cromatografía en capa fina utilizando el sistema cloroformo-metanol-agua (65:25:4, v/v/v). Las manchas se visualizan por vapores de yodo, se raspan y se transfieren a viales de centelleo para su conteo. Mediante esta técnica cromatográfica podemos analizar cuantitativamente no solo los productos de reacción, sino también el sustrato, a fin de determinar el porcentaje de PC y AG sobre el total de los lípidos extraídos.

c) *Medida de la radioactividad en PC, AG y LPC*

La radioactividad incorporada se determina por centelleo líquido utilizando como sistema de centelleo:

Tolueno/Tritón-x-100/H<sub>2</sub>O (2:1:0.2, v/v/v)

El tolueno contiene PPO 0.5% y POPOP 0.03%. La presencia de un detergente posibilita la adición de agua al líquido de centelleo (Tolueno) lo que disminuye la adsorción de los lípidos polares sobre la Silicagel.

La Silicagel produce un quenching despreciable en las pequeñas cantidades que se rascan. En todas las muestras se efectuó la corrección del quenching con el estándar externo.

#### II.4. AISLAMIENTO DE LA LIPOLECITINA: LIPOLECITINA ACILTRANSFERASA

Las sucesivas etapas de aislamiento y purificación se esquematizan en la figura 12. Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura de 4°C.

##### II.4.1. Aislamiento de fracción soluble

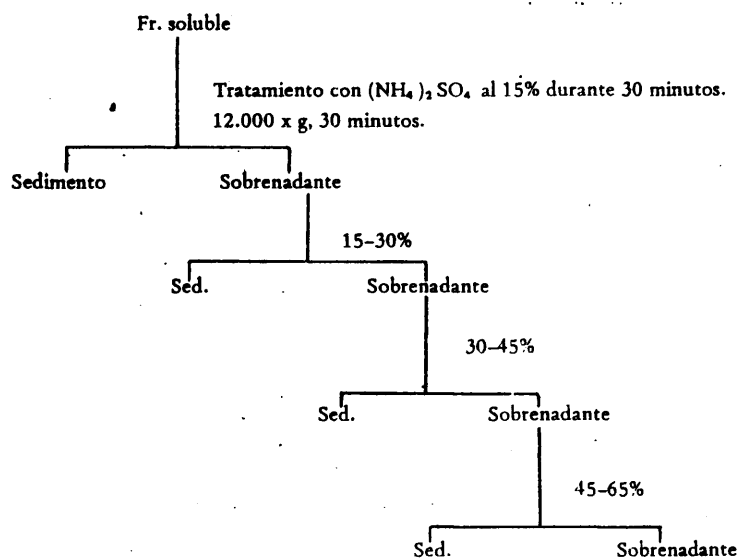
Los pulmones se perfunden con una solución de KCl al 15% con el fin de eliminar al máximo la sangre de los vasos sanguíneos. A continuación, se trocean y se homogeneizan en Omni-Mixer (Sorvall) durante 2-3 minutos, con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6.8 que contiene sacarosa 0.25 M, glicerol al 10% y EDTA 1 mM, en la proporción 3 ml. de tampón/gr. de tejido.

El homogeneizado se centrifuga a 27.000 x g durante 15 minutos en una centrifuga Sorvall RC2B, por dos veces. El sobrenadante post-mitocondrial, previa filtración por gasa doble, se centrifuga a 150.000 x g durante 60 minutos en una ultracentrifuga Beckman, modelo L-5 (Rotor 65). La fracción soluble resultante, que contiene la mayor parte de la actividad *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa*, se somete a las siguientes etapas:

##### II.4.2. Precipitación con sulfato amónico. Redisolución y diálisis

###### a) Tratamiento con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

La saturación con sulfato amónico, necesaria para una precipitación óptima se determinó según el esquema siguiente:



En todos los pasos se determinó la actividad de la enzima en el sedimento y en el sobrenadante, utilizando la misma concentración de proteínas para todas las fracciones.

El sulfato amónico finamente pulverizado se añade a la fracción soluble, lentamente y bajo agitación constante hasta una saturación del 65%. Posteriormente se mantiene la solución con agitación magnética a 4°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifuga a 12.000 x g durante 30 minutos. La actividad se recupera en el sedimento.

#### b) Redisolución y diálisis

El precipitado se resuspende con un homogeneizador de vidrio-teflón en un volumen máximo de 50 ml. de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.8 que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10%. La disolución se dializa frente a 2 litros del mismo tampón durante 14-16 horas. Las proteínas que precipitan durante la diálisis se eliminan por centrifugación a 12.000 x g durante 30 minutos.

### II.4.3. Cromatografía en DEAE-celulosa

#### a) Preparación del cambiador

El cambiador, DEAE-celulosa, se trata con 15 volúmenes de HCl 0.5N durante 30 minutos, lavándose a continuación con agua destilada hasta pH 6.0. El proceso se vuelve a repetir dos veces con NaOH 0.5N, lavándose con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. El sobrenadante se decanta después de cada lavado, una vez que la resina haya sedimentado, para eliminar las partículas finas que acompañan al material comercial.

Posteriormente el cambiador se suspende en tampón fosfato potásico 0.05M pH 3.0, renovándose el tampón hasta obtener un pH menor de 4.5, en orden a proceder a la desgasificación de la resina en una trompa de vacío, con agitación ocasional, durante 3-4 horas. Al cabo de este tiempo se lleva a pH neutro por sucesivos lavados con tampón fosfato potásico 0.05 M pH 8-9, equilibrándose a continuación con tampón fosfato potásico 0.05 M pH 6.8 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10%. El cambiador se conserva, hasta su utilización, en este tampón, a 4°C.

#### b) Adsorción y elución de la lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa

El sobrenadante postdialisis se aplica en una columna de DEAE-celulosa (2.5 x 26 cm.) equilibrada con tampón fosfato potásico 0.05 M conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10%, y se lava con 300 ml. del mismo tampón hasta que el eluido quede libre de proteínas. A continuación se eluyen las proteínas adsorbidas con un gradiente discontinuo de NaCl (75, 125, 150 y 200 mM) en tampón de equilibrado, pasando 130 ml. de cada eluyente. Fracciones de 10 ml. se recogen en un colector Redi-Rac (LKB) equipado con un registro continuo Uvicord II.

La actividad de, lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa se obtiene con el eluyente NaCl 125 mM. Las fracciones activas se reúnen y se conservan a 4°C hasta su posterior tratamiento.

#### c) Regeneración

El cambiador se trata con 250 ml. de tampón de equilibrado conteniendo NaCl 1 M, para eliminar todas las proteínas que han quedado retenidas fuertemente. A continuación se lava exhaustivamente con agua destilada para retirar el NaCl y después con tampón fosfato potásico 0.05 M pH 4 en orden a proceder a su desgasificación, siguiendo a continuación los mismos procesos explicados anteriormente (Preparación del cambiador).

#### II.4.4. Concentración en polietilenglicol

Las fracciones activas reunidas se dializan frente a 1.5 litros de una solución de polietilenglicol al 15% en agua destilada, durante 16 horas bajo agitación fuerte y constante.

La solución de proteínas se concentra hasta 2-4 ml. y las paredes de la bolsa de diálisis se lavan con tampón fosfato potásico 0.05 M pH 6.8 conteniendo NaCl 0.5 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM y glicerol al 10% hasta un volumen final de 8-10 ml. Las proteínas que precipitan durante el proceso se eliminan por centrifugación a 20.000 x g durante 20 minutos.

#### II.4.5. Cromatografía en Aca-44

##### a) Preparación del gel

La hidratación del gel se consigue manteniendo el sólido comercial (Ultrogel Aca-44, LKB, 4% acrilamida y 4% agarosa) durante 3 días a temperatura ambiente en un exceso de agua destilada. El proceso puede acelerarse manteniendo el gel en baño de agua hirviendo durante 3-5 horas. Para su desgasificación se somete a vacío en trompa de agua agitando ocasional y cuidadosamente.

El gel hidratado y desgasificado se deposita en una columna cromatográfica (2.6 x 100 cm.) y se lava exhaustivamente con el sistema de elución: tampón fosfato potásico 0.05 M pH 6.8 conteniendo NaCl 0.5M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10%, previamente desgasificado.

##### b) Cromatografía de la fracción de lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa

Las fracciones activas obtenidas del DEAE-celulosa y concentradas conjuntamente hasta un volumen máximo de 8-10 ml. se aplican en la columna previamente equilibrada. Se eluye con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 45-50 ml/h. Las fracciones con actividad de lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa se conservan a  $-60^{\circ}\text{C}$ .

Una vez realizada la cromatografía, la columna se lava con el sistema de equilibrado quedando así dispuesta para su posterior utilización.

#### II.4.6. Cromatografía en Hidroxiapatito

Este tipo de cromatografía sólo se lleva a cabo en aquellas ocasiones en las que interesa

un preparado enzimático de elevada pureza (por ej.: para la determinación del peso molecular) ya que si bien supone un aumento significativo del grado de purificación, se observa sin embargo una disminución considerable del rendimiento.

Las fracciones activas obtenidas en el proceso anterior se reúnen y se dializan frente a un litro del tampón utilizado anteriormente pero sin NaCl, durante 12 horas.

*a) Preparación del gel*

La cantidad de hidroxilapatito (Biogel HTP-Bio Rad Laboratories) utilizado para montar la columna es de 0.3 gr. de hidroxilapatito/ml. de lecho del gel, cargándose 5 mgr. de proteína por ml. de lecho. El hidroxilapatito se suspende en un exceso de tampón fosfato potásico 0.05M. pH 6.8 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM y glicerol al 10% y se equilibra por lavados sucesivos con dicho tampón.

*b) Adsorción y elución*

El dializado anterior se aplica en una columna de 0.8 x 4 cm. y se lava con 10 ml. del tampón de equilibrado. A continuación, las proteínas se eluyen con un gradiente discontinuo de tampón fosfato potásico 100, 150 y 200 mM conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM y glicerol al 10%, pasando 3 ml. de cada eluyente. La fracción activa se recoge en el tampón 150 mM y se conserva a -60°C en fracciones de 1 ml.

Una vez finalizada la cromatografía, el gel se desecha ya que la utilización del hidroxilapatito regenerado conduce a una pérdida de la actividad enzimática de *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa*.

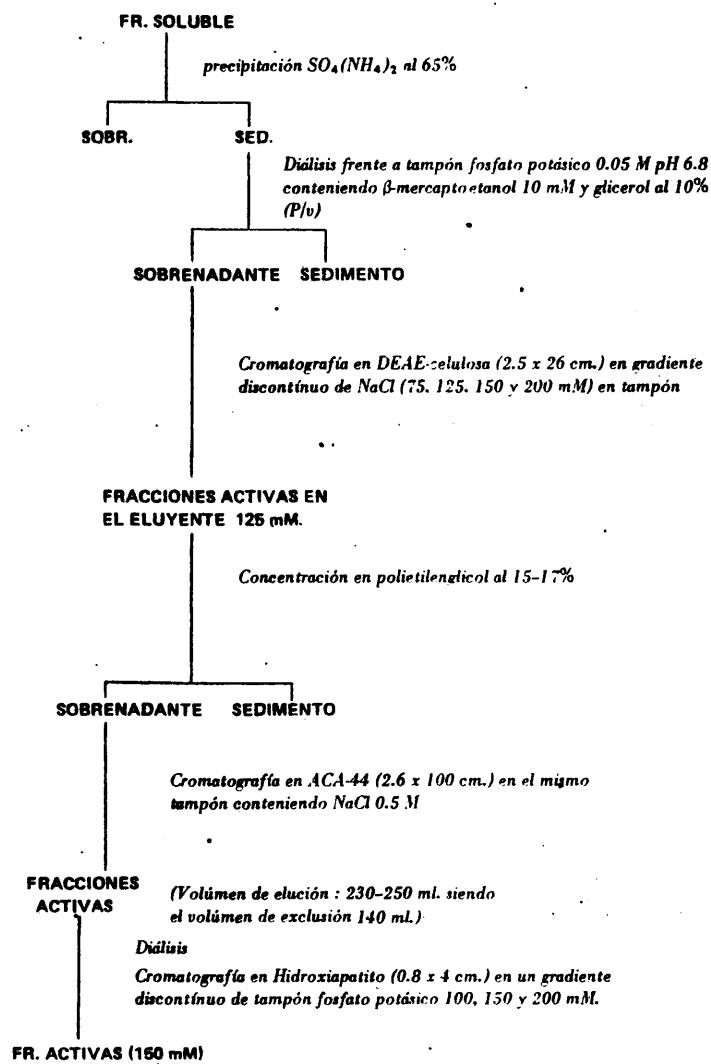


Fig. 12. Etapas del aislamiento de lisolecitina:  
lisolecitina aciltransferasa.



#### II.4.7. Valoración de proteínas

En todas las etapas del proceso de aislamiento se lleva a cabo la valoración de proteínas de las fracciones activas por el método de Ross y Schalz (1973) que consiste en una modificación del método de Lowry (1951) en orden a carboximetilar los grupos SH del  $\beta$ -mercaptoetanol presente en los tampones de aislamiento. Dichos grupos absorben a la misma longitud de onda que el complejo formado por la adición de los reactivos del método de Lowry, conduciendo a una determinación errónea de la concentración de proteínas.

##### — Procedimiento

Se añade a cada tubo 0.2 ml. de muestra con una cantidad de proteínas comprendida entre 10-100  $\mu$ g. A continuación se adicionan 0.2 ml. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.375 M, NaOH 0.1 M y 0.1 ml. de iodoacetato sódico 2N preparado en el momento. La mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. El  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  neutraliza el HI que se produce al reaccionar el iodoacetato con el  $\beta$ -mercaptoetanol del tampón en que van disueltas las proteínas.

Posteriormente se adicionan a cada tubo 2.5 ml. del sistema siguiente, preparado en el momento de su utilización:

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3% en NaOH 0.1 N/ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2%/tartrato sódico-potásico al 4%  
(100:1:1, v/v/v)

La mezcla se agita y se deja en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se añaden 0.25 ml. del reactivo Folin-Ciocalteu (Merk) diluido 1/2 y después de 30 minutos se lee la absorbancia frente a un blanco constituido por 0.2 ml. del tampón de aislamiento (con o sin NaCl 0.5 M) y el resto de los reactivos mencionados anteriormente. La concentración de proteínas en cada muestra se determina mediante una curva patrón de absorbancias, a 750 nm, frente a concentraciones conocidas de albúmina cristalizada de suero de bovino (Sigma Chemical Co.) disuelta en el tampón de aislamiento.

#### II.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS

El proceso se lleva a cabo en placas de poliacrilamida del 7,5% según el método de Laemmli (1970) modificado por Chapman et al., (1976).

— *Procedimiento*

*a) Preparación del sistema de placas*

Se utilizan dos placas de electroforesis (20 x 20 cm.) unidas entre si por sus bordes laterales e inferior con vaselina o agar mediante un sistema de 3 soportes de 0.3 mm. de espesor, quedando un espacio entre las placas del mismo espesor, donde polimerizan los geles.

*b) Preparación de los geles superior e inferior*

Se parte de las siguientes soluciones:

Solución A : Acrilamida al 30.4% (p/v) y bisacrilamida al 0.8% (p/v) en agua destilada. La solución se filtra a través de papel Whatman nº 1.

Solución B : SDS (dodecilsulfatosódico) al 4% (p/v) en tampón tris HCl 1.5 M, pH 8.8.

Solución C : SDS al 4% (p/v) en tampón tris HCl 0.5 M, pH 6.8.

Solución D : Persulfato amónico al 10% (p/v) en agua destilada. Esta solución se prepara en el momento de su utilización.

*Gel inferior del 7,5% de poliacrilamida*

Para su formación se mezclan las soluciones A, B y agua destilada en la proporción 1:1:2 (v/v/v). La mezcla se desgasifica a vacío con agitación ocasional, a temperatura ambiente. A continuación se añaden 2.5 µl de TEMED (N, N, N', N' - tetrametil - etilen - diamina) y 20 µl de solución D por cada 4 ml. de la mezcla anterior y el conjunto se introduce rápidamente en el espacio existente entre las dos placas de electroforesis, llenándose hasta una altura de 13 cm. A continuación, se adiciona cuidadosamente agua destilada hasta formar una capa de 2 cm. de altura, que evita la deshidratación del gel y la formación de menisco. La polimerización tiene lugar en 30 minutos aproximadamente, a temperatura ambiente. Finalizada esta, se vierte el agua que cubre el gel y se procede a la polimerización del gel superior.

*Gel superior*

Es de menor grado de reticulación (4.5% de poliacrilamida), utilizándose para concentrar la muestra y facilitar su separación. Para la formación del gel superior se mezclan las

soluciones A, B y agua destilada en las proporciones 0.6:1:2.4 (v/v/v) y se desgasifica la mezcla a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 4  $\mu$ l de TEMED y 16  $\mu$ l de solución D por cada 4 ml. de la mezcla anterior y el conjunto se deposita encima del gel inferior, hasta casi el borde superior de la placa. A continuación, se introduce una pieza a modo de peine alrededor de la cual polimeriza el gel superior, formándose los depósitos de aplicación de muestras (pocillos).

*c) Preparación de muestras y electroforesis*

Las muestras se dializan frente a agua destilada para eliminar el glicerol y la KOH presente en el tampón de aislamiento, y se liofilizan. El residuo sólido se disuelve en tampón tris HCl 60mM, pH 6.8 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% (v/v), glicerol al 10% (p/v) y SDS al 3% (p/v) y se calienta a 100°C durante 4 minutos en baño de agua.

La concentración de la muestra así preparada debe ser de 1.5-2 mg/ml., aplicándose cantidades de 30  $\mu$ l en cada pocillo de la placa. En los depósitos o pocillos de los extremos se aplica azul de bromofenol al 0.01% (p/v) en el mismo tampón, como referencia de migración.

El tampón utilizado en las cámaras superior e inferior de la cubeta de electroforesis es tris HCl 25 mM, pH 8.8 conteniendo glicocola 0.2M y SDS al 1% (p/v). Para la realización de la electroforesis se aplica una intensidad de corriente de 35 mA por placa, mediante una fuente de tensión LKB modelo 3371 D. El proceso dura 4 horas aproximadamente, al cabo de las cuales el gel se extrae cuidadosamente por separación de las placas.

*d) Localización de las proteínas*

Se lleva a cabo por tinción con azul de Coomassie, por tratamientos sucesivos de 1-2 horas de duración, con tres sistemas:

- |             |   |
|-------------|---|
| Sistema I   | Azul de Coomassie al 0.03% (p/v) en una disolución de etanol-acético-agua en la proporción 25:10:65 (v/v/v) |
| Sistema II  | Azul de Coomassie al 0.003% (p/v) en una disolución de etanol-acético-agua (10:10:80, v/v/v)                |
| Sistema III | Azul de Coomassie al 0.001% (p/v) en una disolución de etanol-acético-agua (1.5:10:88.5, v/v/v)             |

El exceso de colorante se elimina por lavados sucesivos por ácido acético al 10% (v/v). La placa del gel puede conservarse en la solución de ácido acético diluido o en bolsas de plástico herméticamente cerradas y humedecidas interiormente por esta solución.

## II.6. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

Se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacridamida con SDS.

Una serie de proteínas patrones se sometieron a electroforesis por el método descrito en el apartado anterior. Las proteínas utilizadas son:

*Albúmina* – suero de caballo. Peso molecular 68.000 (Sober, 1968)

*Piruvato Kinasa* – Músculo de conejo. Peso molecular 57.000 (Steinmetz y Deal, 1966)

$\alpha$ -*amilasa* – *Bacillus subtilis*. Peso molecular 48.460 (Sober, 1968)

*Aldolasa* – Músculo de conejo. Peso molecular 38.953 (Lai et al., 1974)

*Triosa fosfato isomerasa* – Músculo de conejo. Peso molecular 27.000 (Corran y Waley, 1975)

*Histona H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>* – Eritrocito de pollo. Peso molecular 22.000

Todos los pesos moleculares se refieren al monómero correspondiente.

Una vez efectuada la electroforesis se representa el logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa respecto al azul de bromofenol. La interpolación de la movilidad relativa de la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo en la recta patrón, proporciona el peso molecular de la cadena polipeptídica de la enzima.

## II.7. AISLAMIENTO DE CUERPOS LAMELARES

El aislamiento de cuerpos lamelares se llevó a cabo por el método descrito por Engle et al., (1976).

Los pulmones lavados con una solución de KCl al 15% a 4°C, se trocean y se homogeneizan en Potter-Elvehjem de émbolo de teflón con tampón tris HCl 0.01 M pH 7.4 conteniendo sacarosa 0.33M, en la proporción de 10 ml. de tampón/gr. de tejido.

El homogeneizado se centrifuga a 600 x g durante 10 minutos y el sobrenadante que resulta se deposita sobre una solución de sacarosa 0.75M en el mismo tampón, centrifugándose a 40.000 x g durante 40 minutos en un rotor flotante SW-40. Esta centrifugación en gradiente de densidad da lugar a tres bandas: La banda superior, de sacarosa 0.33M, se utiliza para el aislamiento de la fracción soluble mediante centrifugación a 150.000 x g durante 1 hora (Rotor 65). La banda intermedia, de sacarosa 0.54M, está enriquecida en cuerpos lamelares. La banda inferior, de sacarosa 0.75M contiene las mitocondrias y microsomas que se separan posteriormente por centrifugación diferencial.

La fracción enriquecida en cuerpos lamelares se diluye con tampón tris HCl 0.01M, pH

7.4 conteniendo sacarosa 0.58M, efectuándose a continuación una nueva centrifugación en gradiente de densidad con sacarosa 0.33, 0.58 y 0.75 M a 65.000 x g durante 2 horas. La banda que resulta entre el gradiente 0.33-0.58M de sacarosa corresponde a la fracción de los cuerpos lamelares. Dicha fracción se recoge y se diluye con el tampón de homogeneización, centrifugándose a continuación a 56.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se desecha y el sedimento, resuspendido en el mismo tampón se conserva a -20°C hasta su posterior utilización.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

#### III.1. LOCALIZACION SUBCELULAR

La distribución subcelular de la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo se detalla en la Tabla I. Como se puede observar las dos actividades de la enzima, hidrolítica y transacilásica, se encuentran predominantemente en la fracción soluble, estando ausentes en los cuerpos lamelares (Baranska y Van Golde, 1977) así como en los microsomas y mitocondrias.

Tabla I. Distribución subcelular de las actividades de hidrólisis y transacilación de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo.

Fracción	PROTEINA	HIDROLISIS	%	TRANSACILACION	%
	mgr.	actividad específica		actividad específica	
Mitocondrias	372.8	9.2	3.6	4.5	3.2
Cuerpos Lamelares	308	16.2	0.43	4.0	0.2
Microsomas	25	14.4	4.7	6.0	3.6
Fr. soluble	2156	39.6	91	22.0	92.9

Actividad específica: nmoles/min/mgr. proteína.

%: porcentaje de la distribución de la actividad total.

Todas las fracciones subcelulares se aislaron de acuerdo con el método descrito en el apartado II.7, utilizando técnicas de centrifugación diferencial y en gradiente de densidad.

Las concentraciones de proteína en la incubación fueron de 0.2 mgr/ml para la fracción soluble y 0.25 mgr/ml para el resto de las fracciones subcelulares.

### III.2. AISLAMIENTO DE LA LISOLECITINA: LISOLECITINA ACILTRANSFERASA

#### III.2.1. Proceso de aislamiento

En la tabla II se recogen los resultados obtenidos en la purificación de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* a partir de la fracción soluble de pulmón de conejo.

Ambas actividades se purifican conjuntamente, siendo la relación hidrólisis/transacilación igual a 2 en las últimas etapas del proceso. Esta relación sólo se mantiene constante en determinadas condiciones ya que la variación de la concentración del sustrato, de la fuerza iónica, del pH y de la concentración de proteínas modifica la relación como se estudiará posteriormente.

Tabla II. Purificación de *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo.

Etapas	Volúmen	Proteína	Actividad total	Actividad espec.	Purificación	Rendimiento	Relación (a)
	ml.	mgr totales	nmoles PC/min	nmoles PC/min/ mgr	veces	%	H/T
Fr.soluble	190	3572	32862	9.2	—	100	2.5
0.65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	48	1152	32258	28	3.0	98	2.5
Diálisis	57	838	26481	31.6	3.5	80.6	2.7
DEAE- celulosa	136	70	15540	222.0	24.0	47.2	2.1
ACA-44	10	1	732.6	732.6	80.0	2	2

(a) Relación entre las actividades específicas de la hidrólisis y de la transacilación. En la tabla se expone la actividad específica para la reacción de transacilación.

La fracción soluble se obtuvo a partir de 115 gr. de pulmón. Las actividades enzimáticas de hidrólisis y transacilación se determinaron como se describe en el apartado II.3.

Los perfiles de elución obtenidos en la cromatografía en DEAE-celulosa y en ACA-44 se representan en las Figuras 11' y 12' respectivamente.

### III.2.2. Estabilidad de la enzima

Las actividades transacilásica e hidrolítica que aparentemente presenta la enzima desaparecen de forma paralela por repetidos procesos de congelación y descongelación, por liofilización, por acidificación del medio a  $\text{pH} \leq 5$ , por tratamiento térmico a temperaturas superiores a  $50^\circ\text{C}$ , por carboximetilación de la enzima con  $\text{ICH}_2\text{COONa}$  10mM, en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM en los tampones de aislamiento y en presencia de tritón-X-100 al 0.05%. Todo ello unido a que ambas actividades manifiestan un comportamiento cromatográfico idéntico y que la electroforesis de la enzima purificada en gel de poliácridamida en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol da lugar a una sola banda, indica que realmente una única enzima es responsable de las actividades de hidrólisis y de transacilación.

Durante todo el proceso se ha utilizado glicerol al 10% (p/v) en los tampones de aislamiento, así como para el almacenamiento de la enzima a  $-60^\circ\text{C}$ . El glicerol proporciona un medio mas viscoso que en cierta manera simula el ambiente celular en el que se encuentra la enzima siendo, por tanto, mas adecuado para la protección de la conformación nativa de la proteína. Para las proteínas periféricas de membrana que se separan de ésta fácilmente en soluciones de baja fuerza iónica y en presencia de agentes quelantes (Coleman, 1973) en los tampones de homogeneización (vease apartado II.4.1), es importante la presencia de glicerol o sacarosa en el medio para el mantenimiento de la estabilidad estructural ya que la obtención en fracción soluble conlleva un cambio drástico del ambiente nativo Tanford y Reynolds (1976). Necesariamente, las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico están asociadas a membranas y

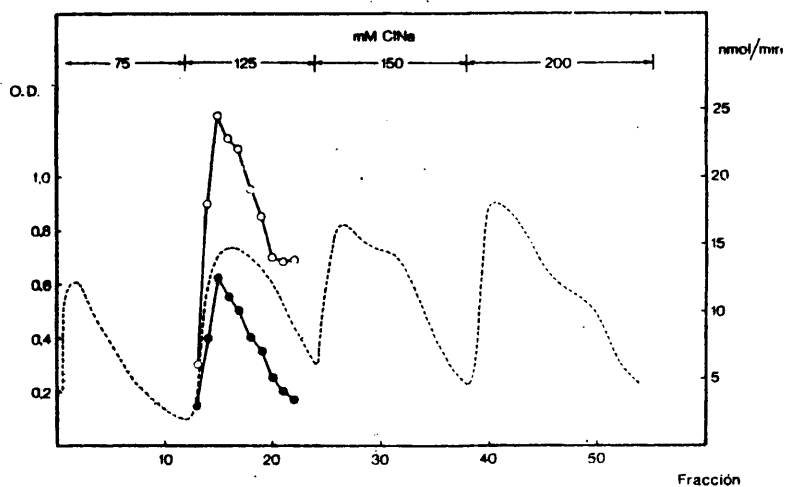


Fig. 11:— Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-celulosa. Absorción a 280 nm (---). Actividad enzimática: de hidrólisis (nmol AG/min, ---), de transacilación (nmol PC/min, ●—●).



principalmente a la membrana microsomal. En este sentido, consideramos que la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* es una proteína periférica de membrana ya que participa en el metabolismo de la fosfatidilcolina cuya ruta biosintética se encuentra localizada en el lado citoplasmático del retículo endoplásmico (Coleman y Bell, 1978). Por otra parte, la fuerte tendencia a la agregación con otras proteínas que manifiesta la enzima y el aumento de su actividad biosintética en presencia de lípidos, que analizamos a continuación, apoyan esta hipótesis.

### III.2.3. Efecto de agregación en presencia y ausencia de NaCl

La tendencia a agregar de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* se pone de manifiesto por la aparición de las actividades de hidrólisis y transacilación en el volumen de exclusión (pico 1) resultante de la cromatografía en ACA-44 en presencia de NaCl 0.5 M (figura 12'a). La recromatografía del pico 2 en ACA-44 en las mismas condiciones (figura 12 b) da lugar a un sólo pico con actividad en un volumen de elución de 240-260 ml, no detectándose en la zona correspondiente al volumen de exclusión de proteínas, ni actividad enzimática, lo que sugiere que la enzima, probablemente, se agrega a otras proteínas. Sin embargo no hay que descartar la posibilidad de que pueda asociarse consigo misma, sólo a concentraciones de proteína altas.

El agregado que se forma presenta una relación hidrólisis/transacilación 2:1 lo que podemos considerar como un índice de la funcionalidad normal de la enzima en las condiciones de concentración de sustrato saturante, pH 6.8 y fuerza iónica alta en las que se trabaja.

Cuando la cromatografía en ACA-44 se lleva a cabo en ausencia de NaCl (Figura 13), gran parte de la actividad se recoge en el primer pico con una relación hidrólisis/transacilación 2:1, siendo esta relación anormalmente alta en el pico 2, lo que es consistente con los estudios realizados, que después se expondrán, respecto a la variación de las velocidades de hidrólisis y transacilación en función de la fuerza iónica.

Respecto al tipo de fuerzas implicadas en la agregación, el que ésta tenga lugar a fuerza iónica baja indica que puede tratarse de interacciones electrostáticas, sin embargo, la agregación a fuerzas iónicas altas (hasta 0.7 M de NaCl) no permite descartar la contribución de las fuerzas hidrofóbicas en este proceso. Por otra parte, se ha llevado a cabo la recromatografía del pico 1 en ACA-44 en presencia de NaCl 0.5 M resultando un sólo pico en el volumen de exclusión, lo que pone de manifiesto la elevada estabilidad del agregado.

Así mismo, hay que considerar la posible implicación de las interacciones entre grupos -SH en el fenómeno de la agregación.

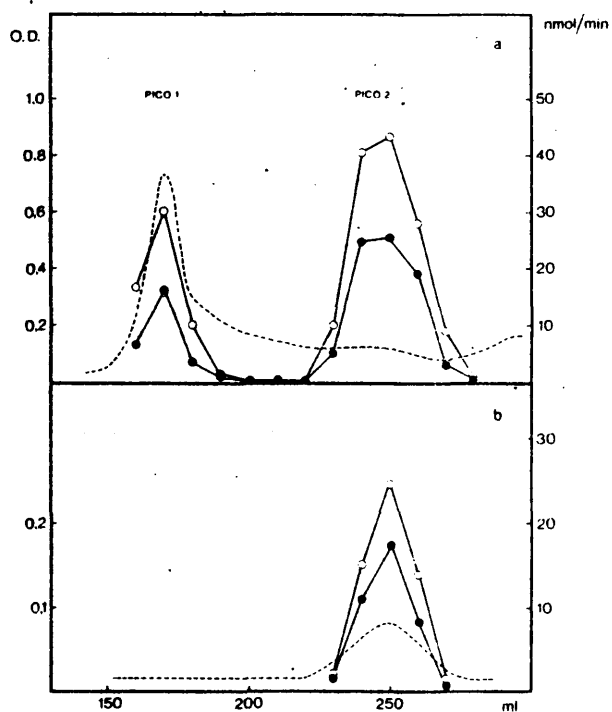


Fig. 12.— (a) Perfil de elución de la cromatografía en ACA-44 en presencia de NaCl 0.5 M. (b) Perfil de elución de la recromatografía del pico 2 en ACA-44 en presencia de NaCl 0.5 M. Símbolos como en la figura anterior.

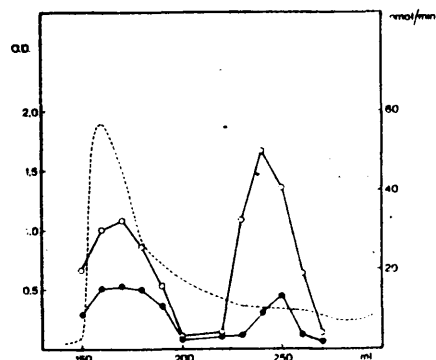


Fig. 13.— Perfil de elución de la cromatografía en ACA-44 en ausencia de NaCl de la fracción DEAE-celulosa 126 mM. Absorción a 280 nm (-----). Actividades enzimáticas: de hidrólisis (nmol AG/min—○—), de transacilación (nmol PC/min—●—).

#### III.2.4. Efecto del $\beta$ -mercaptoetanol en el medio

La eliminación de  $\beta$ -mercaptoetanol del tampón en el que se halla la enzima purificada conduce a una pérdida de actividad significativa, posiblemente por la formación de puentes disulfuro lo que sugiere que si la agregación se produce sin pérdida de actividad, deben estar ausentes este tipo de interacciones en el proceso.

En la tabla III se recoge el efecto de la eliminación de  $\beta$ -mercaptoetanol en el medio. Como se puede observar ello conduce a una disminución de ambas actividades del 60%, manteniendo relación hidrólisis/transacilación constante.

Tabla III.— Disminución de las actividades de hidrólisis y transacilación en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Volúmen de elución ACA-44	Con $\beta$ -mercaptoetanol nmoles/min		H/T	Sin $\beta$ -mercaptoetanol nmoles/min		H/T
	PC	AG		PC	AG	
ml.						
230	8	16	2.0	3	5	1.7
240	10.5	22	2.0	5	11	2.2
250	9	20	2.2	3.6	8	2.2
260	7.4	14	1.9	2.5	5	2.0

### III.3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

La electroforesis de la enzima en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol proporciona una única banda de proteína, con un peso molecular de aproximadamente 60.000 D, obtenido a partir de una serie de proteínas patrones procesadas de la misma forma. En la figura 14 se representa la recta de calibrado para proteínas patrones frente a la movilidad electroforética relativa.

El peso molecular obtenido coincide con el estimado en una columna de ACA-44 calibrada, lo que indica que la enzima consta de una sola cadena polipeptídica. La posibilidad de que se tratase de dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente por puentes disulfuro quedó totalmente descartada al efectuar la electroforesis en presencia de SDS y de  $\beta$ -mercaptoetanol, añadiendo  $\text{ICH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$  en exceso en el disolvente de muestras para bloquear irreversiblemente los grupos -SH libres existentes en la proteína, obteniéndose una sola banda en la misma posición que las obtenidas sin  $\text{ICH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$  y en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol e incluso en ausencia de este agente reductor.

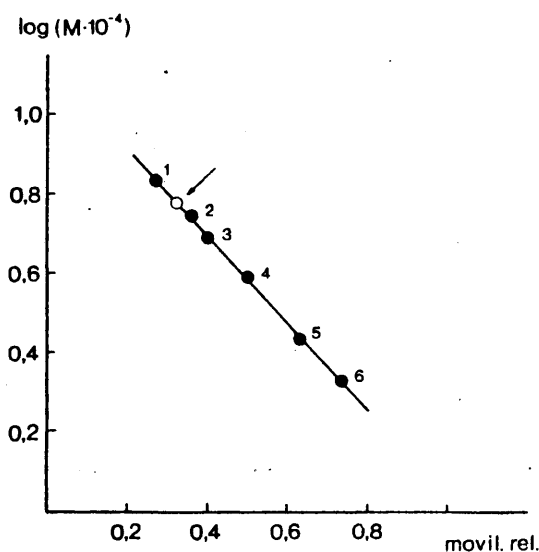


Fig. 14.— Recta de calibrado para proteínas patrones frente a la movilidad electroforética relativa en gels de poliacrilamida conteniendo SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol. Los números corresponden a las proteínas: 1 albumina, 2 piruvato quinasa, 3  $\alpha$ -amilasa, 4 aldolasa, 5 triosa fosfato isomerasa y 6 histona H<sub>1</sub>. La flecha señala la posición obtenida para la lisocistina aciltransferasa de pulmón de conejo.

### III.4. MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR ADICION DE LIPIDOS

Se ha estudiado la modificación de la actividad de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* por adición de diferentes clases de lípidos que adoptan distintos tipos de estructuras en solución acuosa (desde la distribución en bicapa, a la forma hexagonal  $H_{II}$  y micelar). Los experimentos se han llevado a cabo a bajas (0.01-0.1 mM) y a elevadas (0.1-2.0 mM) concentraciones de lípidos.

#### III.4.1. Efecto de los lípidos a bajas concentraciones sobre las actividades de la enzima

En la figura 15 se recoge la modificación inducida en la actividad transacilásica por adición de diferentes clases de lípidos a concentraciones comprendidas entre 0.01-0.1 mM.

En todos los casos se puede observar que se produce un incremento de la actividad de transacilación, siendo del 65% sobre el control a una concentración de 0.05 mM de la mezcla PC/PE/colesterol (35/25/40 en peso), del 47% con dipalmitoilfosfatidilcolina 0.04 mM o ácido palmítico 0.03 mM y del 30% a una concentración de tripalmitina de 0.03 mM.

La activación mínima se produce con TG y la máxima con la mezcla de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol lo que puede tener una explicación en función de la estructura que adoptan en solución las diferentes clases de lípidos añadidos:

- a) La dipalmitoilfosfatidilcolina forma bicapas en solución acuosa. Tales suspensiones multilamelares dan lugar por sonicación a vesículas unilamelares denominadas liposomas.
- b) Los fosfolípidos que componen la mezcla PC/PE/colesterol proceden de yema de huevo y por tanto contienen gran diversidad de especies, saturadas e insaturadas. En este sentido, se ha comprobado que la PE en presencia de PC en la proporción en que se encuentra en la mezcla adquiere preferentemente una estructura de bicapa ya que las fosfatidilcolinas estabilizan su formación. Sin embargo, en presencia de colesterol y si en la mezcla hay especies de PC insaturadas se produce una transición de fase polimórfica de una estructura de bicapa a una hexagonal (Cullis y Kruiff, 1979). El sistema PC/PE/colesterol (35/25/40) utilizado presenta en solución acuosa un polimorfismo de fase por lo que simula la estructura y el comportamiento de los lípidos que componen la membrana.
- c) Los ácidos grasos, a pesar de su estructura anfipática no tienen propiedades micelares a pH neutro ya que el grupo carboxilo de su zona polar no llega a estar ionizado hasta pH 12. Por tanto, los ácidos grasos así como la tripalmitina forman en solución lo que se denomina agregados insolubles.

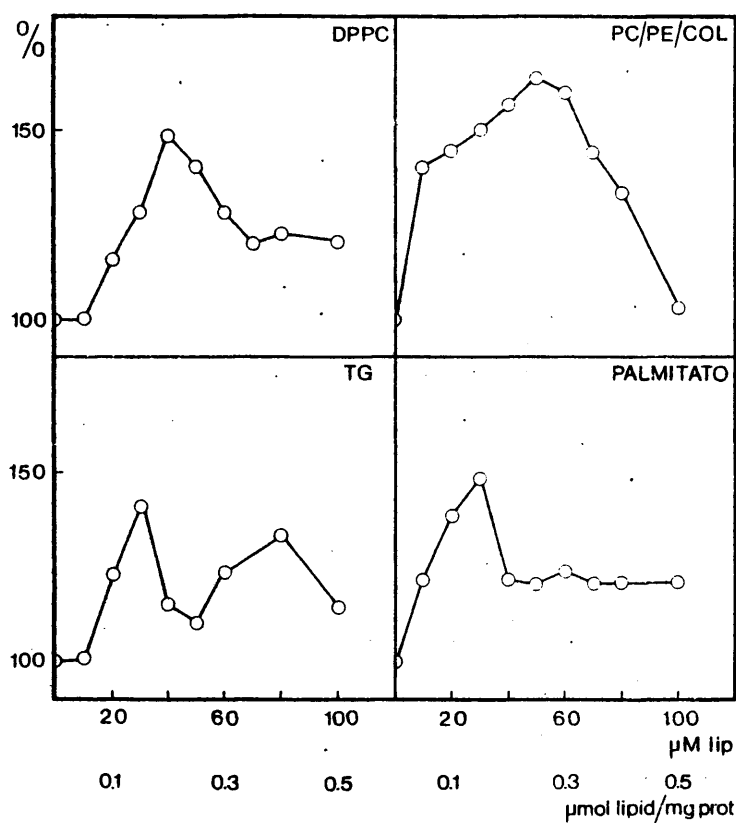


Fig. 15.— Modificación de la actividad transacilásica de la enzima *lecitina aciltransferasa* por adición de diferentes clases de lípidos. Se representa la variación de la actividad de transacilación (expresada como porcentajes del valor control) en función del incremento de la concentración de lípidos en el medio o de la relación lípido/proteína. Los lípidos se sonicaron junto con 0.4  $\mu$ moles de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  palmitoil-LPC (0.05  $\mu$ ci/ $\mu$ mol) en 0.7 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 6.5 y se incubaron con 0.2 mgr de proteína durante 30 minutos a 37°C en un volumen total de 1 ml del mismo tampón que contiene NaCl 0.05 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM y glicerol al 3%.

Teniendo en cuenta las consideraciones estructurales mencionadas, es un hecho evidente, que el marcado efecto estimulante que se observa con el sistema mixto (PC/PE/colesterol) se debe a que simula el ambiente lipídico de las membranas celulares. Por otro lado, el efecto observado por adición de tripalmitina sugiere que cualquier entorno hidrofóbico estimula la actividad transacilásica de la enzima.

Es interesante destacar que los ácidos grasos presentan un efecto estimulante análogo al

de la dipalmitoilfosfatidilcolina, cuando las estructuras que adoptan en solución acuosa son totalmente distintas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado (Jain et al., 1980) mediante técnicas de RMN que mezclas equimoleculares de ácidos grasos y lisofosfatidilcolina forman una organización de tipo bicapa. Ello explicaría que el ácido palmítico conjuntamente sonificado con el sustrato, 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina (que se encuentra a concentración saturante), forme a bajas concentraciones una estructura análoga a la dipalmitoilfosfatidilcolina y por lo tanto tenga un comportamiento similar y el mismo valor de actividad máxima sobre el control.

Con respecto a la actividad hidrolítica se observa una disminución por adición de las distintas clases de lípidos estudiadas. Estos resultados se recogen en la Figura 15 en la que se representa la relación hidrólisis/transacilación frente a la concentración de lípidos en el medio o a la relación lípido/proteína. En la figura se puede observar la gran disminución de la actividad hidrolítica en presencia del sistema mixto PC/PE/colesterol.

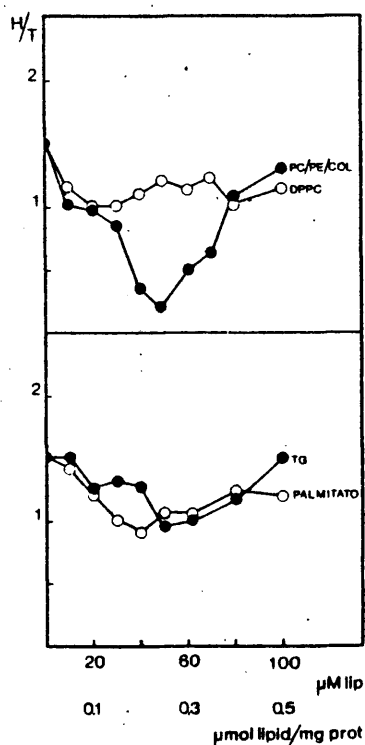


Fig. 15.— Modificación de la relación hidrólisis/transacilación frente a la variación de la relación lípido/proteína o de la concentración de lípidos en el medio.

El hecho de que la adición de una mezcla de lípidos que simula un entorno parecido al que tendría lugar en la célula produzca un incremento en la actividad transacilásica acompañado de una disminución de la hidrólisis nos lleva a plantear la hipótesis de que la actividad hidrolítica que manifiesta la enzima es consecuencia del sistema de estudio *in vitro* en un medio acuoso, siendo posiblemente en el medio celular una enzima exclusivamente biosintética. En un medio acuoso el sustrato se encuentra en dos fases: monomérica y micelar y por otra parte, la estructura de la enzima podría estar, de alguna manera, distorsionada conduciendo a un intermedio enzima-ácido graso muy inestable y por tanto susceptible de hidrólisis. Esta hipótesis la desarrollaremos posteriormente al considerar las propiedades cinéticas de la enzima.

#### III.4.2. Efecto de los lípidos a altas concentraciones sobre las actividades de la enzima

En la figura 17 se recoge la modificación producida en la actividad transacilásica así

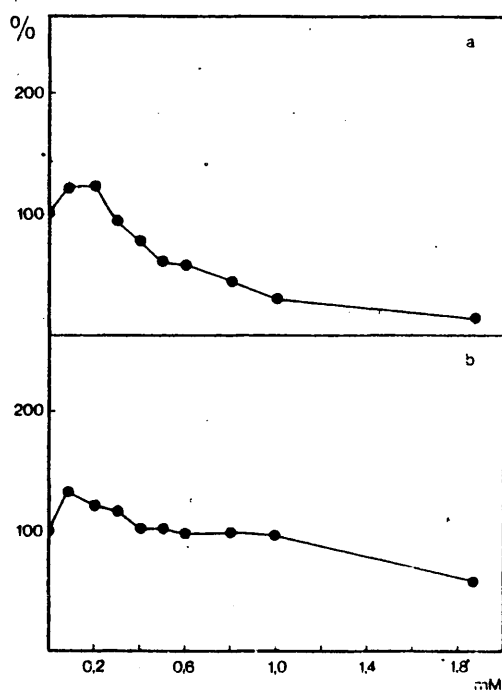


Fig. 17.— Disminución de la actividad transacilásica (expresada como porcentajes del valor control) a concentraciones elevadas de ácido palmítico (a) y del sistema mixto PC/PE/colesterol (35/25/40) (b). Los ensayos enzimáticos se realizaron como se describe en la figura 15.



como en la relación hidrólisis/transacilación por adición de ácido palmítico (a) y del sistema mixto PC/PE/colesterol (b) a concentraciones comprendidas entre 0.1 - 2.0 mM.

La adición del sistema PC/PE/colesterol y de ácido palmítico a concentraciones superiores a 0.4 y 0.3 mM respectivamente da lugar a una disminución de la actividad transacilásica, siendo más marcada con los ácidos grasos.

El ácido palmítico tiene un claro efecto inhibitor sobre las dos actividades hidrolítica y transacilásica como lo demuestra el hecho de que la relación hidrólisis/transacilación se mantiene constante, e igual al valor del control (1.5), a concentraciones inhibitorias. Ya que el ácido palmítico no se comporta como detergente a pH neutro, la inhibición debemos atribuirla a un efecto de adsorción del ácido graso en la enzima que bloquee la accesibilidad del sustrato o bien a un efecto de unión entre el ácido graso y el sustrato para formar una organización de tipo bicapa. Precisamente, a concentraciones de 0.3-0.4 mM la mezcla ácido palmítico/1-palmitoil-lisofosfatidilcolina es equimolecular.

El efecto del sistema mixto PC/PE/colesterol es más complejo ya que concentraciones superiores a 0.4 mM conducen a una disminución de la actividad transacilásica y no de la actividad hidrolítica y la relación hidrólisis/transacilación aumenta a valores superiores a los del control, a concentraciones comprendidas entre 0.4-0.8 mM. A concentraciones superiores se produce una disminución de ambas actividades (fig. 17b). Estos hechos pueden ser explicados a nivel de la incidencia directa de los lípidos en la proteína o a nivel de sustrato, quedando este adsorbido a la fase lipídica y no siendo accesible al centro activo de la enzima. Una o ambas alternativas pueden ser ciertas:

a) *A nivel de sustrato*

La influencia del % molar de lisofosfatidilcolina en la mezcla de lisofosfatidilcolina con el sistema mixto PC/PE/colesterol en la formación de los productos de reacción se recoge en la figura 18.

Podemos observar que en la zona 60-100 % molar de LPC, donde la estructura micelar predomina sobre la estructura bicapa  $\leftrightarrow$   $H_{11}$  formada por el sistema lipídico utilizado, la actividad transacilásica está incrementada con respecto al control siendo máxima al 90% molar de LPC, donde además de la relación hidrólisis/transacilación es 0.2. La actividad disminuye a medida que disminuye la proporción de LPC en la mezcla. En la zona del 35-65% molar de LPC la actividad hidrolítica aumenta respecto el control mientras que la actividad transacilásica es menor, lo que puede ser debido a que el sustrato en forma micelar se integra, en parte, en la estructura lipídica de manera que es menos accesible a la enzima. Sin embargo la forma monomérica del sustrato (que se encuentra a concentración constante cuando la concentración de LPC es superior a la concentración micelar crítica) reacciona con la enzima dando lugar a los ácidos grasos. En este sentido, se demostrará posteriormente que la actividad de hidrólisis sólo se manifiesta con la forma

monomérica del sustrato, lo que es consistente con estos resultados.

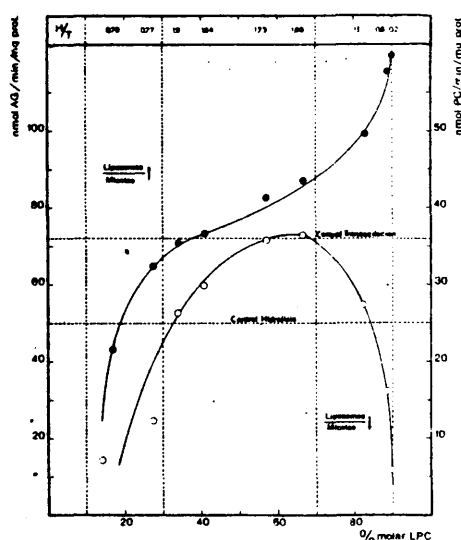


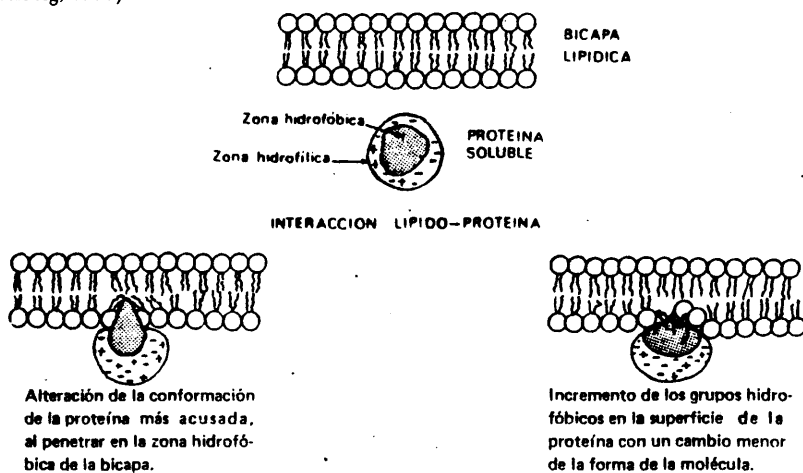
Fig. 18.— Influencia del incremento de la concentración de lípidos en el medio, en la accesibilidad del sustrato a la enzima. Se representan las actividades de hidrólisis (nmol AG/min/μg prot.) y de translocación (nmol PC/min/μg prot.) frente al % molar de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  palmitol-LPC en una mezcla del lisofosfolípido y del sistema mixto PC/PE/colecsterol. La mezcla contiene  $0.4\text{ }\mu\text{mol}$  de  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -LPC ( $0.05\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) y cantidades crecientes del sistema mixto utilizado, sonificados conjuntamente. La incubación se lleva a cabo como se describe en la figura 15. El valor de la relación hidrólisis/translocación se detalla en la zona superior de la figura, siendo el valor control 1.4.

En la zona inferior al 27% molar de LPC, la estructura bicapa  $\leftrightarrow H_{II}$  predomina sobre la micelar. La concentración de lípidos es tan elevada (1-2 mM) que ambas actividades disminuyen significativamente a valores muy inferiores a los del control lo que puede explicarse bien porque estadísticamente la probabilidad de colisión entre el sustrato y la enzima disminuya o bien porque la concentración elevada de lípidos afecte a la integridad estructural de la proteína.

#### b) A nivel de interacción agregados lipídicos-proteína

Se ha comprobado que la interacción de proteínas obtenidas en fracción soluble, periféricas de membrana o no asociadas a esta, con liposomas se realiza por fuerzas electrostáticas entre los residuos polares de la proteína y las cabezas polares de los fosfolípidos y/o por interacciones hidrofóbicas. Si la penetración de la zona hidrofóbica de la proteína en las bicapas lipídicas es muy acusada, se puede producir una alteración de la conformación de la proteína

(Kimelberg, 1976):



En este sentido, cabe la posibilidad de que a una concentración de lípidos mayor que 0.2 mM, la proteína se adsorba a los agregados lipídicos lo que conduciría a un cambio de conformación tal, que la estabilidad del complejo enzima-sustrato sería menor, dando como resultado un aumento de la formación de ácidos grasos.

### III. 5. INFLUENCIA DE MITOCONDRIAS, MICROSOMAS Y CUERPOS LAMELARES EN LA ACTIVIDAD LISOLECITINA: LISOLECITINA ACILTRANSFERASA

La enzima *lisolectina: lisolectina aciltransferasa* se preincubó durante 5 minutos a 37°C con fracciones mitocondrial, microsomal y cuerpos lamelares en orden a investigar si estos orgánulos subcelulares contienen factores que afecten a la actividad transacilásica de la enzima o a la relación de ambas actividades: hidrólisis y transacilación. La cantidad de proteínas totales utilizadas en el ensayo nunca excedió de 0.45 mgr/ml a fin de evitar la inhibición de la actividad transacilásica, fenómeno observado a concentraciones de proteína altas. Los resultados obtenidos, en estas condiciones, se recogen en la figura 19.

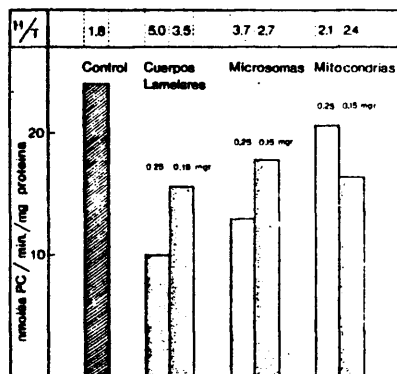


Fig. 19.— Los sedimentos de mitocondrias, microsomas y cuerpos lamelares, obtenidos por centrifugación diferencial y en gradiente de densidad se resuspenden en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.5 hasta una concentración de proteínas de 0.25 mgr/ml. Aliquotas de 0.1 y 0.05 ml se preincuban con 0.2 mgr de *lisolectina: lisolectina aciltransferasa* a 37°, durante 5 minutos. Posteriormente se añaden 400 nmols de 1-<sup>14</sup>C-palmitoil-*l*-isofofosfatidilcolina (0.05 µci/µmol) y se incuban a 37°C durante 10 minutos, en un volumen final de 1 ml.

Los resultados indican que se produce una disminución de <sup>14</sup>C-DPPC a favor de una mayor producción de <sup>14</sup>C-palmitato en cuerpos lamelares > microsomas > mitocondrias, aumentándose por tanto la relación H/T. Previamente habíamos señalado que estos tres orgánulos subcelulares no tienen capacidad de transacilar o hidrolizar este sustrato (apartado III-1), lo que sugiere que esta disminución de la actividad transacilásica puede ser debida a la presencia de lípidos en estas fracciones, especialmente en cuerpos lamelares, orgánulos que almacenan los fosfolípidos que componen el surfactante pulmonar. En este sentido, podemos observar que la disminución es mayor en las fracciones subcelulares que contienen mayor cantidad de lípidos (cuerpos lamelares y microsomas), siendo poco significativa con mitocondrias a las dos concentraciones de proteínas estudiadas. Estos resultados son consistentes con los obtenidos respecto a la influencia de altas concentraciones de lípidos en la actividad transacilásica. Por otra parte, podemos concluir que estas fracciones no contienen ningún factor estimulante de la actividad *lisolectina: lisolectina aciltransferasa*.

### III. 6. PROPIEDADES ENZIMATICAS

#### III.6.1. Actividad de la enzima en función del tiempo

En la figura 20 se representa la variación de las actividades de la enzima en función del tiempo de incubación. Las velocidades de hidrólisis y transacilación se mantienen constantes en todo el intervalo de tiempo estudiado, sin embargo la relación hidrólisis/transacilación disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación, siendo de 3, 2 y 1.5 en los tiempos 5, 10 y 30 minutos respectivamente.

En virtud de estos resultados hemos elegido normalmente un tiempo de incubación de 10 minutos.

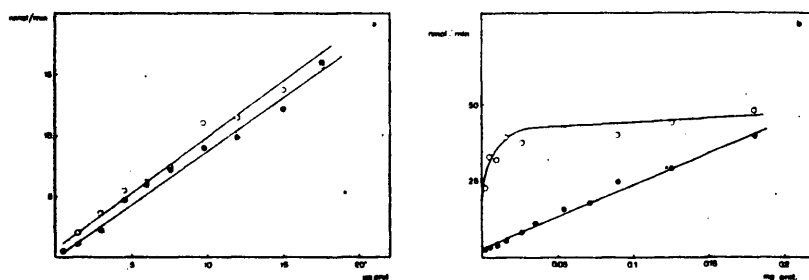


Fig. 21.— Variación de las actividades hidrolítica (○—○) y transacilática (●—●) con el incremento de concentración de proteína. (a) A bajas concentraciones de proteína (0—18 µg/ml). (b) En un intervalo más amplio de concentración de proteína (0—180 µg/ml). El ensayo enzimático se llevó a cabo con 0.4 µmoles <sup>14</sup>C-LPC (9.05 µci/µmol) a 37°C durante 10 minutos en un volumen final de 1 ml en tampón fosfato potásico 0.075 M pH 8.2, NaCl 0.26 M, β-mercaptoetanol 5 mM y glicerol al 5%.

#### III.6.2. Variación de las actividades de la enzima en función de la concentración de proteína

El efecto de la concentración de la enzima purificada en las actividades de hidrólisis y transacilación se recoge en la figura 21 a y b. La actividad transacilásica varía linealmente con el incremento de la concentración de proteína en un intervalo de 0.001-0.18 mgr proteína/ml. En contraste la actividad hidrolítica sólo es lineal a concentraciones muy bajas de proteína 0.001-0.03 mgr/ml. Sin embargo, este comportamiento irregular se observa frecuentemente en enzimas con

sustratos lipídicos. En este sentido, Gatt y Bartfai (1977)<sup>b</sup> estudiaron que la desviación de la linealidad de las curvas  $v$  vs  $E$  es consecuencia de la unión del sustrato lipídico a sitios no catalíticos de la enzima o a otras proteínas añadidas al medio, tal como albúmina.

El comportamiento diferente de la actividad hidrolítica y de la actividad transacilásica con el incremento de la concentración de proteína, puede ser explicado por un fenómeno de adsorción del sustrato en forma monomérica en sitios no catalíticos de la enzima ya que, como se demostrará posteriormente, sólo la forma monomérica del sustrato es hidrolizada por la enzima. También hay que tener en cuenta que la concentración de LPC monomérica es siempre constante e igual a la concentración micelar crítica ( $7.8 \mu\text{M}$ ; Aarsman y Van den Bosch, 1979) y por tanto la concentración de monómeros en soluciones menor que la concentración de LPC en forma micelar a concentraciones de sustrato de  $0.4 \text{ mM}$ . En este sentido, la concentración de sustrato puede ser un factor limitante de la velocidad de hidrólisis.

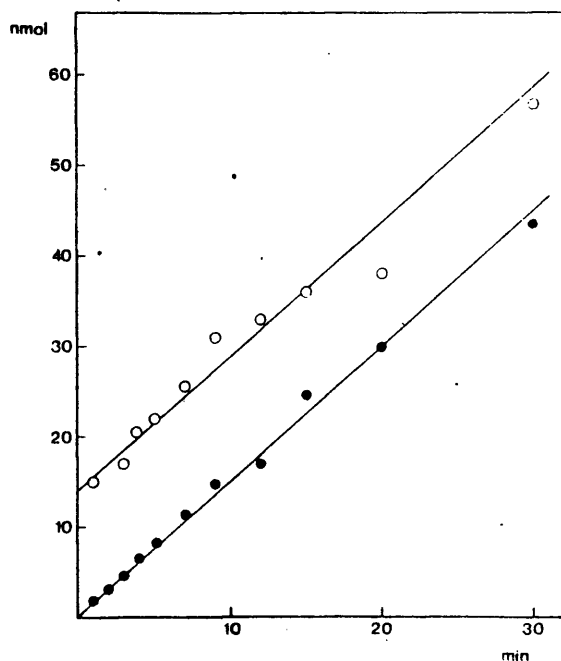


Fig. 20.— Actividad de lipolecitina: lipolecitina aciltransferasa en función del tiempo. El ensayo enzimático se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos, utilizando  $72 \mu\text{g}$  de proteína purificada.

Por otra parte se ha estudiado la variación de las actividades de hidrólisis y transacilación de la enzima no purificada en función del incremento de la concentración de proteína de la fracción soluble (figura 22). La formación de fosfatidilcolina se incrementa hasta una concentración de 0.5 mgr/ml, disminuyendo a concentraciones superiores. La formación de ac. grasos también es lineal con el aumento de la concentración de proteína hasta 0.5 mgr/ml, sin embargo, a partir de este valor se mantiene constante. Ello es debido a la adsorción del sustrato a proteínas que se encuentran en la fracción soluble o bien a la adsorción de proteínas de dicha fracción a la forma agregada del sustrato (de peso molecular  $10^5$ ). Ambos procesos están ampliamente descritos en la enzimología lipídica (Gatt y Bartfai, 1977b). Además, hemos comprobado que la incubación de 0.5 mgr de proteína de fracción soluble con 1.0 mgr de proteínas de fracción enriquecida en cuerpos lamelares que carecen de actividad *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* (Vease apartado III.5) en un volumen final de 1 ml, conduce a una pérdida casi total de la actividad transacilásica, pero no de la actividad hidrolítica.

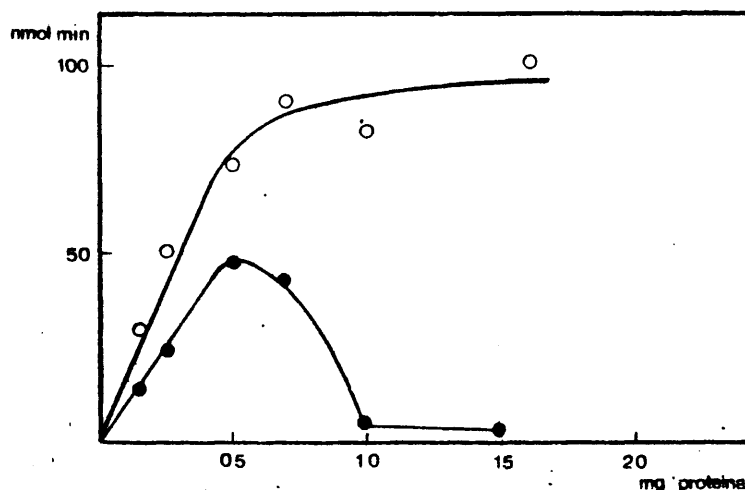


Fig. 22.— Variación de las actividades de hidrólisis y transacilación en función de la concentración de proteínas de fracción soluble.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Abe et al. (1972) que estudiaron la formación de lecitina a partir de lisolecitina en fracción soluble de rata. Sin embargo, dichos autores no consideraron en su estudio la formación de ácidos grasos a partir del mismo sustrato.

De acuerdo con estos resultados hemos utilizado en todos los experimentos una concentración de proteína, ya sea purificada o de fracción soluble, comprendida dentro de la zona lineal de las curvas  $v$  vs  $E$ . Con respecto a la proteína purificada, la curva irregular que presenta la actividad de hidrólisis no se ha tenido en cuenta ya que se han utilizado concentraciones de proteína superiores a 0.03 mgr/ml, considerando en todo momento el tramo lineal observado para la actividad transacilásica.

### III.6.3. Efecto del pH sobre las actividades de la enzima

La influencia del pH en las actividades de hidrólisis y transacilación se representa en la figura 23. El pH óptimo para la actividad transacilásica está comprendido entre [6.8-7.8] en un medio de fuerza iónica 0.125 M. En contraste, el pH óptimo para la reacción de hidrólisis es aproximadamente 8 en el mismo medio.

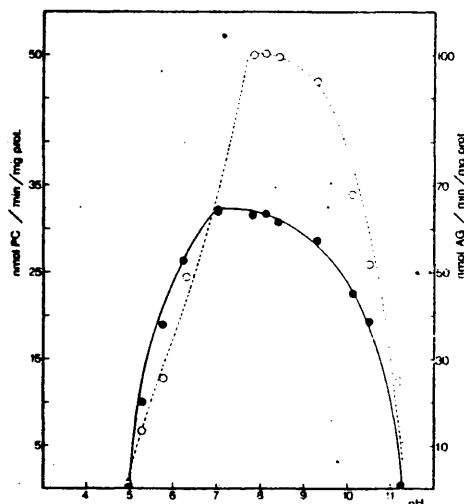


Fig. 23.— Efecto del pH en las actividades transacilásica (—●—) e hidrolítica (---○---) de lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa. Se incubaron 400 nmoles  $^{14}$ C-LPC (0.05  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) con 0.08 mg/ml de proteína en 1 ml de tampón fosfato potásico 0.0875 M, NaCl 0.125 M, glicerol al 2.5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 2.5 mM, durante 10' a 37°C.

Es interesante observar que en la zona de pH comprendida entre [6-6.5] la relación hidrólisis/transacilación es aproximadamente 1.5. En el intervalo [6.5-7] la relación es 2, aumentando a valores superiores o iguales a 3 a pH más alcalinos. En este sentido, a lo largo de todo este trabajo se han utilizado pH comprendidos entre 6.3-6.8.

Por otra parte hay que señalar que el pH óptimo observado para la actividad hidrolítica es el mismo que el encontrado para lisofosfolipasa de mucosa gástrica (Wassef et al., 1978), enzima lábil a altas temperaturas, que no se inhibe por tampones de alta fuerza iónica y no requiere iones  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad, siendo estas características comunes a la enzima lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa.



#### III.6.4. Efecto de la fuerza iónica en las actividades de la enzima

La determinación del efecto de la fuerza iónica se llevó a cabo con proteína parcialmente purificada, procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa. La fracción activa se dializó frente a tampón fosfato potásico 0.05 M, pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y Glicerol 10%. La eliminación del NaCl del medio conduce a una pérdida de la actividad transacilásica del 90%, así como a un incremento de la actividad hidrolítica de 100%. Por otra parte, vimos anteriormente que al cromatografiar el pico 125 mM del DEAE-celulosa en una columna de ACA-44 en ausencia de NaCl (apartado III.2.3), si bien no se produce una eliminación total del NaCl del medio, si una disminución considerable de la fuerza iónica por dilución que conduce a un incremento de la relación hidrólisis/transacilación de la enzima en forma no agregada, que eluye en el pico 2. La proteína agregada que se obtiene en el volumen de exclusión, presenta una relación hidrólisis/transacilación igual a 2 a pH 6.8. Ello indica que sólo la proteína en forma no agregada, parcialmente o totalmente purificada, requiere la presencia de NaCl para su actividad, mientras que la proteína en forma agregada o en fracción soluble no manifiesta ninguna dependencia frente a NaCl.

En la figura 24 se representa el aumento de la actividad transacilásica y la ligera disminución de la actividad hidrolítica con el incremento de la fuerza iónica del medio, utilizando un catión ( $\text{Na}^+$ ) entre 0.05-1.0 M, así como la influencia de un anión ( $\text{F}^-$ ) a concentraciones comprendidas entre 0.001-0.2 M, a fin de determinar si los aniones  $\text{F}^-$  tienen algún efecto sobre la reacción. La concentración de  $\text{F}^-$  utilizada hasta 0.2 M es la que en otras proteínas que utilizan sustratos lipídicos se comporta como inhibidora.

La actividad transacilásica alcanza un máximo valor sobre el control (proteína dializada) a una fuerza iónica de 0.1 M. El anión  $\text{F}^-$  no inhibe dicha actividad, en contraste con otras enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos como la *fosfatidato fosfohidrolasa* de pulmón de rata (Casola et al., 1978, Mauis et al., 1978). El incremento de la concentración de ambos iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{F}^-$  hasta 0.2 M, estimula la actividad transacilásica de manera idéntica (figura 24), aumentando la velocidad de transacilación de la enzima hasta el mismo valor, lo que sugiere que el efecto de ambos iones es exclusivamente aumentar la fuerza iónica del medio. En la tabla IV se recoge el porcentaje de la actividad transacilásica que se recupera tras la adición de  $\text{Na}^+$  o  $\text{F}^-$  0.2 M al preparado enzimático dializado.

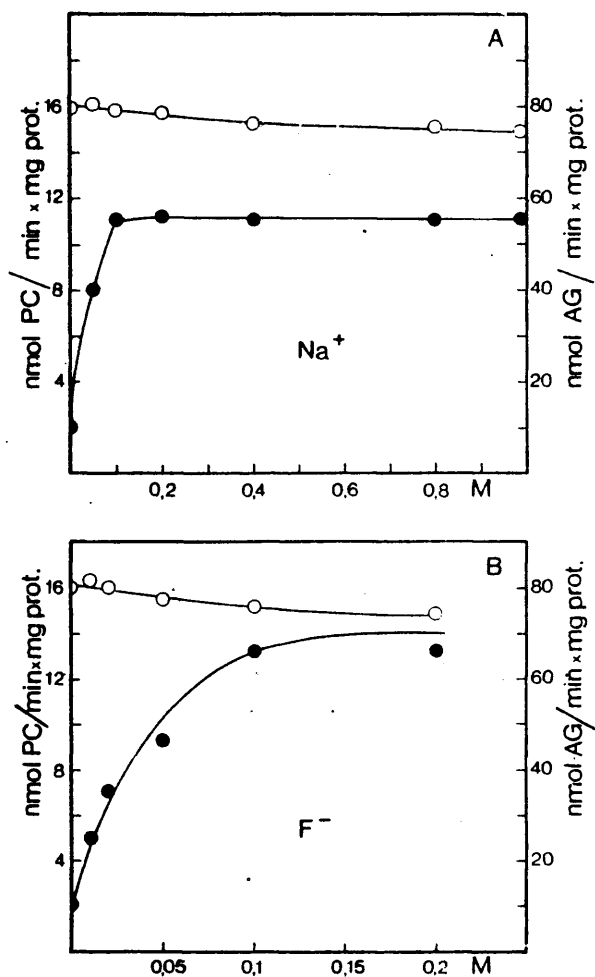


Fig. 24.— Efecto de la fuerza iónica en las actividades de hidrólisis y translocación de la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo. Formación de PC (●—●); AG (○—○). Se incubaron 0.2 mg de proteína dializada, con 0.4 mM  $^{14}\text{C}$ -LPC en 1 ml de tampón fosfato a 0.075 M pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y glicerol al 5% a distintas fuerzas iónicas especificadas en la figura, durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$ .

Tabla IV. Disminución de la actividad transacilásica tras la eliminación de NaCl 0.125 M del medio y recuperación de la actividad por adición de Na<sup>+</sup> o F<sup>-</sup>.

Preparado enzimático	Fuerza iónica	Actividad específica nmoles PC/min/mgr prot.	% recuperación
Antes de la diálisis	0.125 M	22.0	
Después de la diálisis	—	2.1	9.4
Adición de Na <sup>+</sup>	0.2 M	11.2	50.8
Adición de F <sup>-</sup>	0.2 M	13.2	60.0

Por otra parte, es interesante señalar que el incremento de fuerza iónica del medio hasta valores de 1.0 M no conduce a una inhibición de la actividad transacilásica. El hecho de que una fuerza iónica alta no sea inhibidora sugiere que entre la proteína y el sustrato no hay interacción iónica, por lo que estarán implicadas fundamentalmente interacciones hidrofóbicas para el reconocimiento tanto de la zona apolar como de la zona polar del sustrato. Esta zona se encuentra, a pH neutro, en forma de Zwitter-ión, siendo los metilos de la colina, los grupos que deben estar implicados en el reconocimiento de la región polar de la molécula (vease apartado III.8.2).

Respecto a la actividad hidrolítica se puede observar que a fuerza iónica muy baja (0.001-0.002 M) presenta una pequeña estimulación siendo máxima en el intervalo 1-10 mM. A fuerzas iónicas superiores a 0.05 M disminuye sólo un 20-25% de la actividad del control (proteína dializada) (Figura 24 B). Asimismo podemos observar en la figura 24 A que a fuerzas iónicas altas la velocidad de hidrólisis se mantiene constante.

### III.6.5. Efecto de los cationes divalentes en las actividades de la enzima

Se ha estudiado el efecto de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> en las reacciones de transacilación y de hidrólisis. Ambos cationes estimulan de manera significativa la formación de ácidos grasos, incrementando la velocidad de hidrólisis en un 60% a concentraciones comprendidas entre 1.0-2.0 mM de Ca<sup>2+</sup> y en un 87% con 6-8 mM de Mg<sup>2+</sup>. En contraste, el Ca<sup>2+</sup> no afecta significativamente a la actividad transacilásica, mientras que el Mg<sup>2+</sup> si bien tiene un pequeño efecto estimulante a concentraciones inferiores a 2 mM, causa una marcada inhibición a concentraciones superiores,

llegando a ser del 30-40% (Figura 25 A y B).

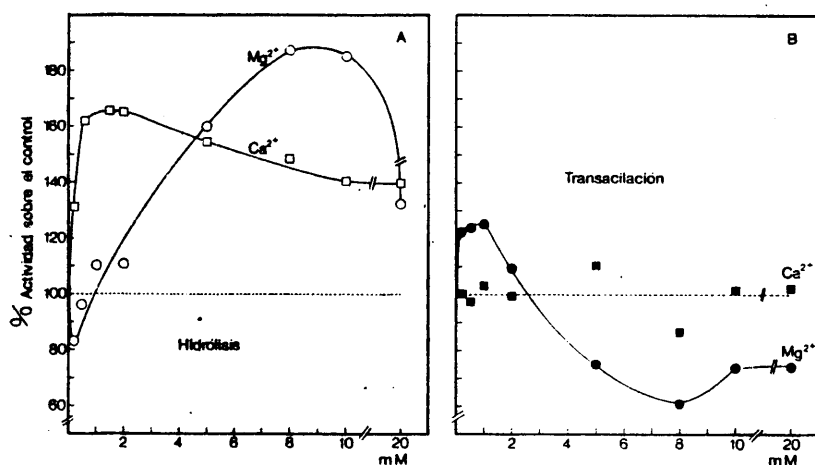


Fig. 25.— Efecto de los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  (—■—) y  $\text{Mg}^{2+}$  (—●—) en las actividades de hidrólisis (A) y transacilación (B). La mezcla de incubación contiene 400 nmoles de  $^{14}\text{C}$ -LPC (0.05  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), 0.2 mgr proteína y distintas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  en 1 ml de tampón tris ClH 0.075 M, pH 6.3, que contiene glicerol al 3%,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM y NaCl 0.05 M. Se preincubó la proteína con los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  durante 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y se incubó durante 30 minutos al adicionar el sustrato.

El hecho de que concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  superiores a 3 mM inhiban la actividad transacilásica y estimulen la actividad hidrolítica sugiere la posibilidad de que el  $\text{Mg}^{2+}$  afecte al equilibrio monómero  $\rightleftharpoons$  micela. La formación de complejos con el fosfato del lisofosfolípido puede dificultar la agregación de monómeros, aumentándose de este modo la concentración micelar crítica. Además, el hecho de que concentraciones superiores a 2 mM de  $\text{Mg}^{2+}$  inhiban la fosfatidato fosfohidrolasa de fracción microsomal de pulmón (Casola et al., 1978) e hígado (Caras y Shapiro, 1975) y que, por otro lado la lisolecitina aciltransferasa de fracción microsomal de pulmón se inhiba por acil-CoA a concentraciones superiores a 20 mM y que en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  10 mM sólo se inhiba a concentraciones superiores a 50 mM (Longmore et al., 1979), sugiere que el  $\text{Mg}^{2+}$  debe actuar a nivel de sustrato, formando en el primer caso complejos con el fosfato del ácido fosfatídico y retardando en el segundo caso la formación de agregados micelares de acil-CoA que no son susceptibles de ataque por la lisolecitina aciltransferasa microsomal. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el  $\text{Mg}^{2+}$  afecte directamente a la enzima lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa.

Por otra parte el efecto estimulante del  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad hidrolítica debe ser atribuido, probablemente, al aumento de fuerza iónica. En este sentido, podemos observar en la figura 25 A que la estimulación es máxima a fuerza iónica comprendida entre 1-12 mM, disminuyendo un 20% a fuerza iónica superior a 30 mM, lo que es consistente con los resultados que se describen en el subapartado anterior.

### III.6.6. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima

En la figura 26 se representa el efecto de la temperatura en la estabilidad de las actividades de hidrólisis y transacilación. Ambas actividades se inhiben totalmente por tratamiento a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

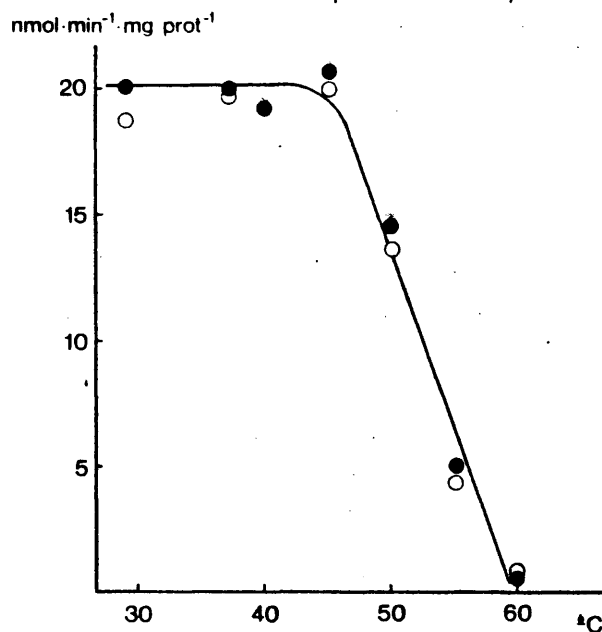


Fig. 26.- Inhibición de las actividades de hidrólisis y transacilación por tratamiento térmico. Se preincubaron 0.08 mgr de proteína durante 5 minutos a las temperaturas indicadas, en 0.2 ml de tampón fosfato potásico 0.05 M pH 8.5, NaCl 0.5 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10%. La preincubación se paró por inmersión de las muestras en hielo. Las actividades enzimáticas se determinaron por incubación con 0.4  $\mu$ moles de  $^{14}\text{C}$ -LPC (49.05  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) suspendidos en 0.8 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 8.0, durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### III.6.7. Variación de las velocidades de hidrólisis y transacilación en función de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre las velocidades de las reacciones de hidrólisis y transacilación catalizadas por la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* se determina mediante la representación del logaritmo de la  $V_{max}$  frente a las inversas de la temperatura absoluta. La energía de activación ( $E_a$ ) de Arrhenius se obtiene a partir de la pendiente de la recta entre las temperaturas 29-50°C (figura 27).

$$\text{Lg } K = \frac{E_a}{2.3 RT} \cdot \frac{1}{T} + \text{Lg } A$$

El coeficiente de temperatura  $Q_{10}$  se calcula por el cociente de las velocidades de reacción a temperaturas  $T + 10$  y  $T$  en el tramo lineal de la gráfica.

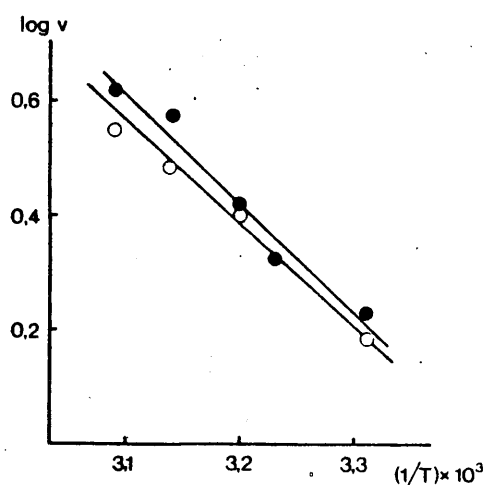


Fig. 27.— Determinación de la  $E_a$  mediante la representación del  $\lg V_{max}$  frente a  $1/T \times 10^3$ . Se incubaron 0.08 mgr de proteína y 0.4  $\mu$ moles de  $^{14}\text{C}$ -LPC (0.06  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) durante 5 minutos a temperaturas comprendidas entre 29–50°C, en las que la proteína es activa, en un volumen final de 1 ml de tampón fosfato potásico 0.06 M pH 6.3, NaCl 0.1 M,  $\beta$ -mercaptoetanol mM y glicerol al 2%. Velocidad de hidrólisis (○—○), transacilación (●—●).

Las energías de activación calculadas para las reacciones de hidrólisis y transacilación se exponen en la tabla V.

Tabla V. Cálculo de la energía de activación y del coeficiente de temperatura para la hidrólisis y la transacilación

Reacción	Energía de activación	Coeficiente de temperatura
Hidrólisis	8.25 Kcal / mol	1.3
Transacilación	8.70 Kcal / mol	1.4

Los valores de energía de activación tan similares, indican que posiblemente para ambas reacciones la fase limitante de velocidad es la donación del acilo, ya que la formación del complejo acil-enzima es común para la reacción de hidrólisis y transacilación.

#### III.6.8. Modificación de las actividades enzimáticas en presencia de $\text{ICH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$

Las actividades de hidrólisis y de transacilación se inhiben totalmente por tratamiento de la enzima purificada con  $\text{ICH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$  10 mM durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  (figura 28).

Varios autores han puesto de manifiesto que la enzima se inhibe por tratamiento con diisopropilfluorofosfato (Tsao y Zachman, 1977; Vianen y Van den Bosch, 1978; Wykle et al., 1980) lo que sugiere que un resto de serina debe estar implicado en la catálisis y posiblemente en la formación del complejo acil-enzima.

Asimismo, la inhibición que se produce por tratamiento con  $\text{ICH}_2\text{COONa}$  unido a la necesidad de la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en el tampón para mantener la enzima activa, indica que uno o mas grupos -SH deben contribuir directa o indirectamente en la catálisis enzimática. Recientemente, Van Heusen et al. (1981) no han conseguido detectar la liberación de grupos -SH en la desacilación de la enzima lo que sugiere que si los grupos -SH participan, no lo hacen uniéndose al acilo.

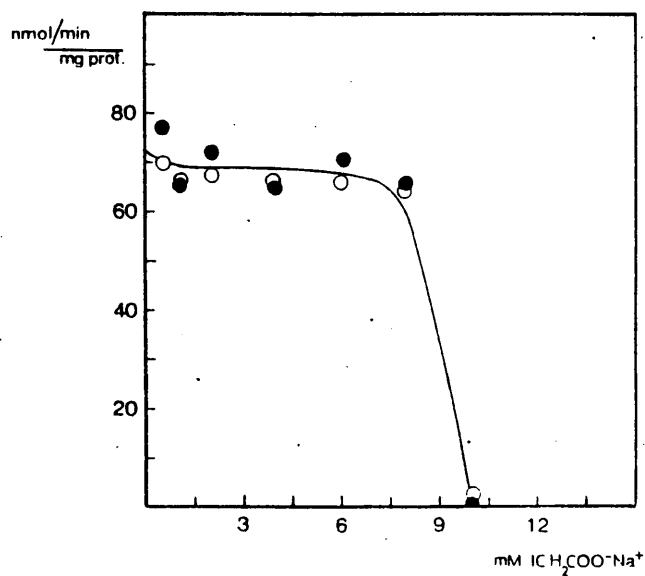


Fig. 28.— Inhibición de la isolecitina: isolecitina aciltransferasa por tratamiento con  $\text{ICH}_2\text{COONa}$ . La enzima purificada (0.075 mgr) se preincubó durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con  $\text{ICH}_2\text{COONa}$  en las cantidades que se indican, en un volumen de 0.7 ml. La preincubación se paró por inmersión de las muestras en hielo. La incubación se inició por adición de 0.4  $\mu\text{moles}$  de  $^{14}\text{C}$ -LPC en un volumen final de 1 ml de tampón fosfato potásico 0.08 M, pH 6.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, NaCl 0.2 M y glicerol al 2% y se llevó a cabo durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .



### III.7. ESTUDIOS CINETICOS

Una reacción enzimática en la que el sustrato es un lípido está fuertemente influenciada por el hecho de que la reacción se lleve a cabo en un medio acuoso ya que el sustrato es insoluble o muy poco soluble en agua.

El sustrato utilizado por la enzima, que estamos estudiando, es un lípido anfipático soluble y por tanto no requiere agentes solubilizantes o un medio especial de dispersión, sino que en solución acuosa forma espontáneamente agregados multimoleculares (micelas) con un peso molecular del orden de  $10^5$ , cuando la concentración de los monómeros alcanza unos niveles críticos. Estos agregados coloidales forman una fase homogénea en agua.

Teniendo en cuenta que el valor de la concentración micelar crítica (CMC) para la 1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina es  $7.8 \mu\text{M}$  (Aarsman y Van den Bosch, 1979), cuando la concentración total del sustrato ( $S_t$ ) sea menor que este valor se encontrará en forma monomérica, mientras que a concentraciones de sustrato superiores a  $7.8 \mu\text{M}$ ,  $S_t = S_{m0} + S_{m1}$  (siendo  $S_{m1}$  la concentración de sustrato en forma micelar). La concentración máxima de monómeros será  $S_{CMC}$  y se mantendrá constante a concentraciones de sustrato superiores a este valor (Figura 29).

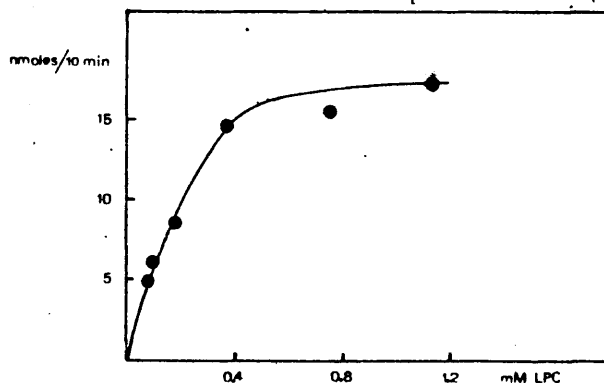


Fig. 29.— Concentraciones de la forma monomérica y micelar de un lípido anfipático soluble en relación a la concentración total del lípido. Las unidades de concentración son arbitrarias.

Por otra parte, se ha tenido en cuenta la hidrólisis no enzimática del sustrato en un medio acuoso (Figura 30).

La hidrólisis del enlace ester llega a ser de un 10% cuando el sustrato está en forma monomérica, disminuyendo progresivamente a medida que aumenta la concentración de sustrato. A concentraciones saturantes para la enzima de 0.3-0.4 mM utilizadas a lo largo de este trabajo, la hidrólisis es del 5%. Por otro lado, la hidrólisis depende del pH del medio; a pH 11 es máxima y presenta, además, un pequeño máximo a pH comprendidos entre 6.8-7, lo que no interfiere en nuestros resultados ya que siempre se ha trabajado a pH comprendidos entre 6.3-6.8. Teniendo en

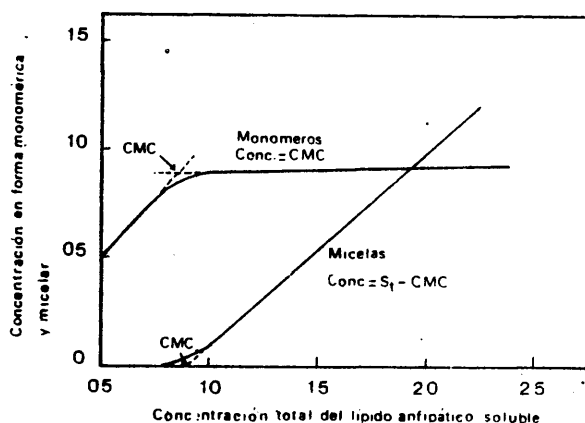


Fig. 30.— Hidrólisis no enzimática del sustrato.

cuenta estas consideraciones hemos estudiado los parámetros cinéticos de la enzima y proponemos un posible mecanismo de reacción de la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* en nuestras condiciones de ensayo.

### III.7.1. Determinación de parámetros cinéticos

En la figura 31 A se representa la variación de las velocidades enzimáticas de hidrólisis y transacilación frente a la concentración de sustrato. La curva que describe la velocidad de hidrólisis en función del incremento de la concentración de la lisofosfatidilcolina, sigue una cinética de saturación Michaeliana. En contraste, la curva que describe la actividad aciltransferasa se desvía significativamente de la hipérbola rectangular típica.

En la figura 31 B se representa la influencia de la concentración del sustrato en la zona inferior y superior a la concentración micelar crítica, en las actividades de hidrólisis y transacilación. Como se puede observar, a concentraciones inferiores a CMC únicamente tiene lugar la formación de ácidos grasos, manifestándose la actividad transacilásica sólo a concentraciones superiores a 7.8  $\mu\text{M}$ , es decir, cuando se empiezan a formar agregados micelares.

La determinación de parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{max}$  para las reacciones de hidrólisis y transacilación se realizó en base a la ecuación de Hanes-Woolf:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

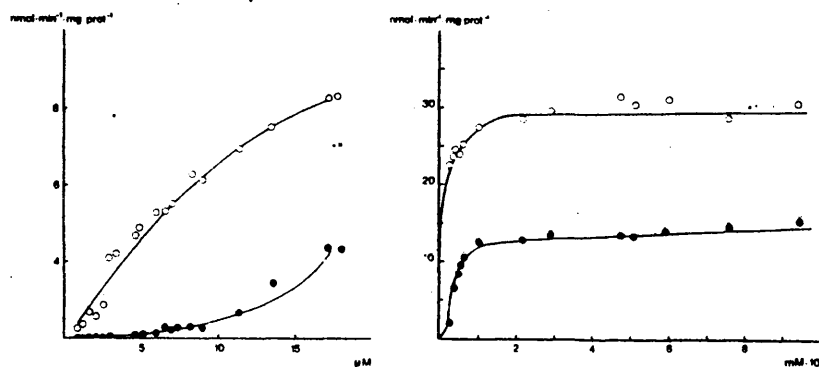


Fig. 31.— Variación de las velocidades enzimáticas de hidrólisis (nmol AG/min/mg proteína, —●—) y de transacilación (nmol PC/min/mg proteína, —○—) en función del incremento de la concentración del sustrato. En (A) se utilizaron concentraciones de  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -LPC ( $0.1\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) superiores a la CMC ( $7.8\text{ }\mu\text{M}$ ) y  $80\text{ }\mu\text{g}$  de proteína. En (B) se utilizaron concentraciones de sustrato  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -LPC ( $1\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inferiores y superiores a la CMC y  $44\text{ }\mu\text{g}$  de proteína. Ambos se incubaron durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en un volumen final de  $1\text{ ml}$ . de tampón fosfato potásico  $0.075\text{ M}$  pH  $8.8$ ,  $\text{NaCl}$   $0.25\text{ M}$ ,  $\beta$ -mercaptoetanol  $5\text{ mM}$  y glicerol al  $5\%$ .

Los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  se calculan ajustando la recta de regresión (Figura 32) por el método de mínimos cuadrados ponderados. Los parámetros calculados se recogen en la tabla VI. Debido al carácter sigmoideo de la curva que describe la velocidad de transacilación en función del incremento de la concentración del sustrato, debemos considerar la  $K_{M_{trans}}$  como una  $K_M$  aparente.

Tabla VI.— Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y velocidad máxima ( $V_{max}$ ) para las actividades de hidrólisis y transacilación de la enzima purificada *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo.

Actividad	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nmol/min/mg proteína)
Transacilásica	$33.8 \pm 0.2$	$15.22 \pm 2.1$
Hidrolítica	$10.7 \pm 0.1$	$30.3 \pm 0.9$

La  $K_{M_H}$  y  $V_{M_H}$  calculadas a partir de los datos de la variación de velocidad obtenidos a altas y bajas concentraciones de sustrato coinciden.

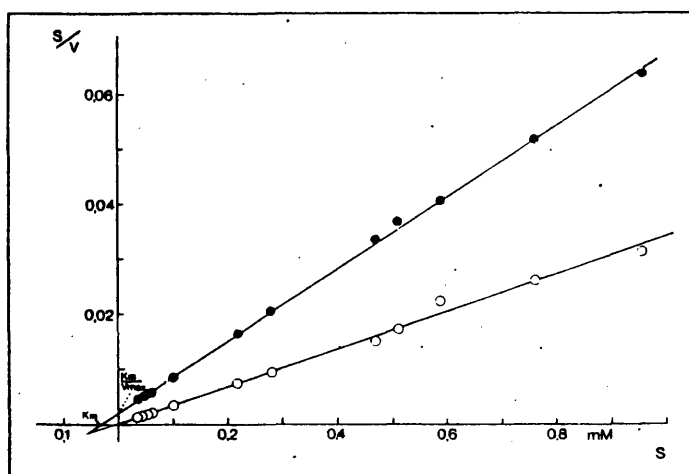


Fig. 32. — Representación de Hanes-Woolf para las actividades de transacilación (●-●) y de hidrólisis (○-○).

### III.7.2. Posible mecanismo de reacción de la enzima

Los resultados descritos anteriormente ponen de manifiesto que la enzima puede reaccionar con ambas formas de sustrato, monomérica y micelar y que a concentraciones de sustrato inferiores a la CMC sólo tiene lugar la reacción de hidrólisis. La concentración del sustrato en el medio influye en la formación de ácidos grasos y de fosfatidilcolina y por tanto a concentraciones inferiores a la concentración saturante, para la reacción de transacilación la relación hidrólisis/transacilación será muy elevada. En este sentido, la relación 30:1 descrita por Abe et al. (1974) para las actividades de hidrólisis y transacilación de la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de rata, se debe probablemente a la utilización de una concentración de sustrato de 30  $\mu\text{M}$  en los ensayos enzimáticos.

Si bien cuando  $S_t$  es menor que  $S_{CMC}$ , es decir  $S_t = S_{m0}$ , se demuestra experimentalmente que solo se manifiesta la actividad hidrolítica de la enzima, es preciso determinar si a concentraciones de sustrato superiores a la concentración micelar crítica ( $S_t = S_{m0} + S_{m1}$ ) ambas formas de sustrato son susceptibles de hidrolizarse o transacilarse.

#### a) Actividad de hidrólisis

La actividad hidrolítica de la enzima solo tiene lugar cuando el sustrato se une a la enzima en forma monomérica como lo demuestra el hecho de que la ecuación de velocidad para la actividad de hidrólisis es

$$V = \frac{V_H \cdot [S]}{K_{M_H} + [S]}$$

ya que la hipérbola rectangular calculada teóricamente a partir de esta ecuación coincide con la calculada experimentalmente a concentraciones de sustrato inferiores y superiores a la concentración micelar crítica. Estos resultados indican que el sustrato en forma micelar  $S_{m1}$  no es susceptible de hidrólisis ya que si no la curva experimental correspondería a la ecuación de velocidad determinada considerando la competitividad de ambas formas del sustrato por la enzima:

$$v = \frac{V_{m0} S_{m0}}{K_{m0} + \frac{K_{m0}}{K_{m1}} S_{m1} + S_{m0}} + \frac{V_{m1} S_{m1}}{K_{m1} + \frac{K_{m1}}{K_{m0}} S_{m0} + S_{m1}}$$

En este sentido podemos concluir que

$$K_{MH} = K_{Mm0}$$

$$V_{MaxH} = V_{m0}$$

#### b) Actividad de transacilación

El hecho de que no se observe actividad transacilásica cuando  $S_t = S_{m0}$  indica que la reacción de transacilación sólo tiene lugar cuando el sustrato está formando agregados micelares.

Por otra parte, hemos calculado los parámetros  $K_M$  y  $V_{max}$  para el sustrato en forma micelar ( $K_{m1}$  y  $V_{m1}$ ) representando  $S_{m1}/V - V_{SCMC}$  frente a  $S_{m1}$  (Gatt y Bartfai, 1977a) ya que conocemos en todo momento  $S_{m1} = S_t - S_{SCMC}$  y la velocidad de transacilación a la concentración micelar crítica ( $V_{SCMC}$ ).

Los valores de  $K_{m1}$  y  $V_{m1}$  calculados a partir del ajuste de la recta de regresión (figura 33) por el método de los mínimos cuadrados ponderados son

$$K_{m1} = 30.7 \pm 1 \mu M$$

$$V_{m1} = 15.38 \pm 0.3 \text{ nmol/min} \times \text{mgr proteína}$$

Siendo  $V_{SCMC} = 0.2 \text{ nmoles/min/mgr proteína}$  y considerando  $S_{SCMC} = 7 \mu M$

De ello se deduce que

$$K_{m1} = K_{MT}$$

$$V_{m1} = V_{MT}$$

demostrándose de este modo que a  $S_t > S_{CMC}$  la actividad transacilásica solo se manifiesta cuando el sustrato se une a la enzima en la forma micelar.

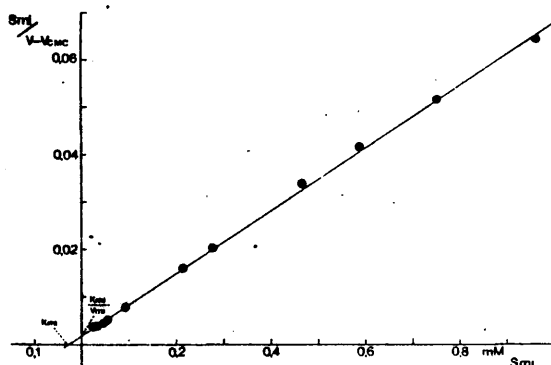
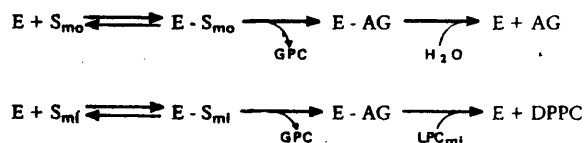


Fig. 33.— Determinación de los parámetros  $K_m$  y  $V_{mi}$  mediante la representación de Hanes-Woolf para la actividad transacilásica.

Los resultados expuestos anteriormente sugieren que el mecanismo de reacción en nuestras condiciones de ensayo sería el siguiente:



Se producen de forma paralela dos reacciones diferentes con la misma enzima y con el mismo sustrato debido a que este se encuentra en dos formas distintas en solución acuosa.

La formación de ácidos grasos a partir de monómeros puede ser debida a un factor estadístico ya que al estar las  $LPC_{mo}$  muy diluídas en el medio acuoso es más probable que se realice el ataque nucleófilo al carbono del grupo carbonilo del intermedio acil-enzima, por una molécula de agua que por el grupo hidroxilo del carbono de la posición *sn*-2 de la  $LPC_{mo}$ .

Por otro lado, cuando el sustrato se une a la enzima en forma micelar es más fácil que el aceptor de acilo sea otro fosfolípido ya que la estructura de las micelas está estabilizada energéticamente por las fuerzas de dispersión de London que se establecen entre las cadenas hidrocarbonadas de los monómeros a distancias intermoleculares muy pequeñas y esta gran proximidad entre las moléculas de LPC impide la hidrólisis. De este modo, la enzima actúa sobre micelas de lisofosfatidilcolinas convirtiéndolas en bicapas de dipalmitoilfosfatidilcolina.

Además de la estructura del sustrato debemos considerar también la estructura de la enzima la cual puede modificarse al estar en un medio acuoso, distinto del medio celular. En este sentido, hemos comprobado (vease subapartados III.6.3 y III.6.4) que la eliminación de la fuerza iónica del medio y a  $\text{pH} > 7$ , la relación hidrólisis/transacilación aumenta lo que sugiere que la estructura de la enzima se modifica conduciendo a un intermedio acil-enzima más inestable.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores parece evidente que la actividad hidrolítica se produce como consecuencia del sistema de estudio *in vitro* por la presencia del sustrato en forma monomérica y por la inestabilidad del intermedio acil-enzima. Por otra parte la actividad hidrolítica no tiene ninguna justificación fisiológica ya que la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* es una enzima biosintética que está implicada en la síntesis del componente mayoritario del surfactante pulmonar: DPPC. Además, intracelularmente la enzima debe actuar sobre el sustrato lipídico integrado en la membrana por lo que la hidrólisis no debe manifestarse. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la adición al medio de una mezcla de lípidos (PE/PC/colesterol) cuya estructura es similar a la que forman los lípidos de membrana, causa una gran disminución de la actividad de hidrólisis a favor de un aumento significativo de la actividad de transacilación (vease apartado III.4.1).

Por otro lado el hecho de que en experimentos *in vivo* en ratas (Akino et al., 1972), en cortes de tejido pulmonar de conejo (Abe et al., 1973) y en cultivos celulares de pneumocitos tipo II (Batemburg et al., 1979; Mason y Dobbs, 1980; Wykle et al. 1980) no se haya puesto de manifiesto, o al menos no se mencione, la hidrólisis de lisofosfatidilcolina sugiere el carácter exclusivamente biosintético de esta enzima.

Sin embargo, también debemos considerar la posibilidad de que, realmente, se trate de una lisofosfolipasa y que la reacción de transferencia sea un artefacto del sistema *in vitro*. De hecho la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* tiene propiedades enzimáticas comunes con la lisofosfolipasa de mucosa gástrica, estudiada por Wassef et al. (1978), como son su pH óptimo para la hidrólisis, la no inhibición a fuerzas iónicas elevadas, su inestabilidad por tratamiento térmico y la no dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otra parte se ha demostrado que las serin-proteasas pueden sintetizar péptidos si se utilizan como agentes desacilantes aminoras o aminoácidos, así como muchas nucleasas y glucosidasas pueden también catalizar reacciones de transferencia. Sin embargo, el hecho de que sólo la enzima aislada de fracción soluble pulmonar sea capaz de sintetizar DPPC en cantidades significativas y no lo sean las lisofosfolipasas aisladas de otros tejidos (pancreas, hígado) (Brumley y Van den Bosch, 1977) sugiere que la reacción de transacilación no se debe a las condiciones de ensayo. Quizás el dato más concluyente al respecto, sea la observación de Oldenburg y Van Golde (1976) en pulmón fetal de rata y de Tsao y Zachaman (1977) en pulmón fetal de conejo de que la actividad de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* aumenta muy significativamente un día antes del nacimiento, alcanzando unos niveles superiores a los del adulto y mayores a los de otras enzimas implicadas en la síntesis *de novo* de la fosfatidilcolina, lo que sugiere que en el término de la gestación el mecanismo de transacilación es de gran importancia en la formación y en el mantenimiento de los niveles de dipalmitoilfosfatidilcolina.

### III.8. ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA

La *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* es altamente específica para lisofosfolípidos tanto como donadores como aceptores de acilo. En este sentido, hemos comprobado que moléculas anfipáticas insolubles como los fosfolípidos no actúan como donadores de acilo y que el  $1\text{-}^{14}\text{C}$  palmitato ( $58\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) no se incorpora en la posición *sn*-2 de la  $1\text{-}\{(9, 10)\text{-}^3\text{H}_2\}$  - palmitoil - *sn* - glicero - 3 - fosfocolina ( $0.162\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), encontrando una relación  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$  igual a cero cuando se incuban  $0.4\text{ }\mu\text{moles}$  de  $^3\text{H}$ -LPC con  $0.3\text{ nmoles}$  de  $^{14}\text{C}$ -palmitato durante 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen final de 1 ml de tampón fosfato potásico  $0.1\text{ M}$  pH 6.8. Estos resultados indican que la enzima sólo reconoce moléculas anfipáticas solubles cuya cabeza polar tenga una estructura análoga a la de LPC y no un grupo carboxilo.

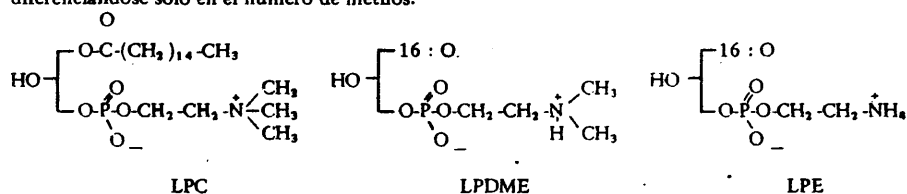
Análogamente, Vianen y Van den Bosch (1978) han demostrado que compuestos que carecen de la zona hidrófoba como *sn*-glicero-3-fosfocolina o de la zona hidrófila como los monoglicéridos o de ambos como el glicerol no son utilizados como aceptores o como donadores de acilo por la enzima.

Por tanto los estudios de especificidad de la enzima que vamos a discutir se refieren a la zona hidrófoba e hidrófila de los lisofosfolípidos.

#### III.8.1. Especificidad respecto a la zona hidrófila del sustrato

El reconocimiento de la cabeza polar de la molécula del sustrato no se lleva a cabo por interacciones electrostáticas ya que como hemos visto anteriormente (subapartado III.6.4), fuerzas iónicas elevadas no inhiben las actividades de transacilación y de hidrólisis de la enzima. Sin embargo, el hecho de que la molécula esté en forma de ión doble a pH neutro, puede ser importante para el reconocimiento de esta zona ya que se ha demostrado (Vianen y Van den Bosch, 1978) que la lisofosfatidilserina (LPS) y el ácido lisofosfatídico (LPA) con carga neta negativa no son sustratos de la enzima.

En orden a determinar si los grupos metilo de la colina están implicados en el reconocimiento de la zona hidrófila, quizás por interacciones hidrofóbicas, hemos estudiado las actividades de hidrólisis y de transacilación de la enzima con  $1\text{-}\{(9, 10)\text{-}^3\text{H}_2\}$  palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y con 1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfodimetiletanolamina. Ambos lisofosfolípidos tienen la misma cadena hidrocarbonada y la misma carga que el sustrato, diferenciándose sólo en el número de metilos.





III.8.1.1. Actividad de la enzima con 1-[ (9, 10) -  $^3\text{H}_2$  ]-palmitoil- sn-glicero-3-fosfoetanolamina y estudios de competitividad entre  $^3\text{H}$ -LPE y 1- $^{14}\text{C}$  palmitoil-sn-glicero-3-fosfolina

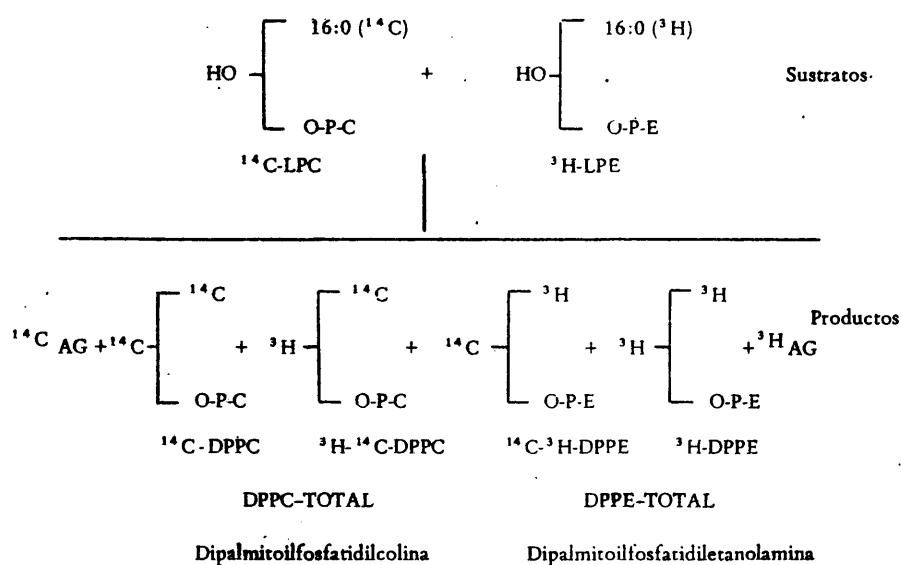
En la Tabla VII se compara la actividad de la enzima con 1- $^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC y con 1-[ (9, 10) -  $^3\text{H}_2$  ]- palmitoil-LPE, sustratos que sólo se diferencian en la zona polar de la molécula. Se observa que la enzima presenta mayor actividad de hidrólisis y de transacilación con  $^{14}\text{C}$ -LPC que con  $^3\text{H}$ -LPE lo que indica cierta selectividad por la zona polar del sustrato. Por otra parte, el comportamiento de la enzima con ambos sustratos es similar, presentando una relación hidrólisis/transacilación 2:1.

Tabla VII.— Actividad de hidrólisis y transacilación de *lisolecitina aciltransferasa* en presencia de sustratos que difieren en la base nitrogenada.

Sustrato 0.3 mM	Transacilación nmoles PL/min/ mgr proteína	Hidrólisis nmoles AG/min/ mgr proteína	Relación H/T
$^{14}\text{C}$ -LPC (0.05 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ )	55	107	1.94
$^3\text{H}$ -LPE (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ )	32.5	70	2.15

Estos resultados son más concluyentes en los estudios de competitividad entre ambos sustratos.

Al incubar la enzima con una mezcla de  $^{14}\text{C}$ -LPC y  $^3\text{H}$ -LPE a concentraciones variables de  $^3\text{H}$ -LPE en la mezcla se pueden formar los siguientes productos de reacción:



Como fase previa a la incubación se sonicaron 0.3  $\mu$ moles de  $^{14}\text{C}$ -LPC y cantidades variables (0.1-0.8  $\mu$ moles) de  $^3\text{H}$ -LPE en 0.5 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.8. Este proceso da lugar a la formación de micelas mixtas de LPE y LPC. La composición de la micela se irá enriqueciendo en LPE a medida que aumenta el % molar de LPE en la mezcla. Asimismo, la concentración monomérica de LPC varía, siendo dependiente en todo momento de la concentración de LPE, de manera que el incremento del % molar de LPE en la mezcla conduce a una disminución de la concentración monomérica de LPC y a un aumento de la de LPE.

La formación de micelas mixtas es un hecho importante a tener en cuenta ya que en los estudios de competición entre sustratos no podemos referirnos a la concentración de cada uno por separado sino al % molar de uno de ellos en la mezcla.

En la Figura 34 se representa la actividad transacilásica de la enzima con micelas mixtas de LPC/LPE. Como se observa en la Figura 34 A, la formación de  $^{14}\text{C}$ -DPPC a partir de dos moléculas de  $^{14}\text{C}$ -LPC disminuye con respecto al control a medida que aumenta el % molar de LPE en la mezcla ya que la probabilidad de interacción entre dos moléculas de  $^{14}\text{C}$ -LPC como donadora y aceptora de acilo es menor. Asimismo, no se observa síntesis de  $^3\text{H}$ -DPPE hasta que el % molar de LPE en la mezcla es igual al de LPC. En este punto, la biosíntesis de  $^3\text{H}$ -DPPE se dispara, estabilizándose rápidamente al 66-77% molar de LPE.

Por otra parte, podemos observar en la Figura 34 B que la síntesis de  $^3\text{H}$ - $^{14}\text{C}$ -DPPC siendo  $^3\text{H}$ -LPE el donador de acilo y  $^{14}\text{C}$ -LPC el aceptor de acilo, aumenta progresivamente, así como la síntesis de  $^{14}\text{C}$ - $^3\text{H}$ -DPPE, siendo  $^{14}\text{C}$ -LPC el donador de acilo y  $^3\text{H}$ -LPE el aceptor de acilo. A todas las concentraciones de  $^3\text{H}$ -LPE estudiadas, la síntesis de  $^3\text{H}$ - $^{14}\text{C}$ -DPPC es mayor que la síntesis de  $^{14}\text{C}$ - $^3\text{H}$ -DPPE, aún cuando la concentración de LPE en la mezcla es superior al doble de la de LPC, lo que sugiere que la enzima es más específica por LPC que por LPE y esta especificidad se manifiesta fundamentalmente en la reacción de transferencia de acilo de manera que muestra mayor preferencia por la LPC como aceptor de acilo que por la LPE.

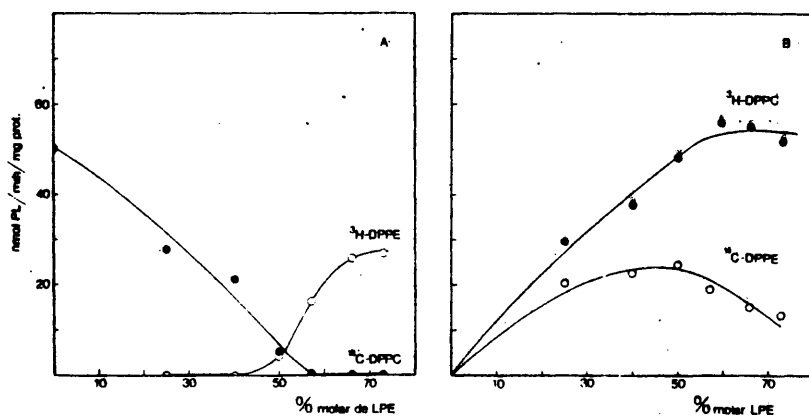


Fig. 34.- Actividad transaccilica de la enzima con micelas mixtas de LPC/LPE. (A) Síntesis de  $^{14}\text{C}$ -DPPC (●-●) y  $^3\text{H}$ -DPPE (○-○) a partir de dos moléculas de  $^{14}\text{C}$ -LPC y  $^3\text{H}$ -LPE respectivamente. (B) Síntesis de DPPC con marcado doble, siendo el donador de acilo distinto isotopofosfolípido que el aceptor. Las incubaciones se llevaron a cabo con 0.3  $\mu\text{moles}$  de  $^{14}\text{C}$ -LPC (0.05  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), cantidades variables (0.1-0.8  $\mu\text{moles}$ ) de  $^3\text{H}$ -LPE (0.2  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) y 80  $\mu\text{g}$  de proteína purificada, durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen final de 1 ml de tampón fosfato potásico 0.075 M pH 6.8, NaCl 0.25 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y glicerol al 5%.

Finalmente, hemos determinado la formación total de DPPC y de DPPE así como la relación entre ambos fosfolípidos (Tabla VIII). La cantidad total de DPPC/min/mgr de proteína sintetizada a partir de micelas mixtas de LPC/LPE no varía significativamente con el incremento del % molar de LPE en la mezcla, presentando además un valor igual al encontrado para micelas puras de  $^{14}\text{C}$ -LPC.

Tabla VIII.— Formación de DPPC y DPPE totales. Relación entre ambos fosfolípidos.

% molar de LPE en la mezcla	DPPC Total nmoles/min/ mgr. proteína	DPPE Total nmoles/min/ mgr proteína	DPPC/DPPE	LPC/LPE
0	55.0	—	—	—
25	56.5	20.4	2.77	3
40	56	21.4	2.6	1.5
50	52	28.7	1.8	1
57	58.8	33.8	1.5	0.75
66	55.5	42	1.32	0.5
73	50.4	39	1.29	0.375

Estos resultados indican que si bien la enzima puede utilizar LPE como sustrato ello no causa la inhibición de la síntesis de DPPE, que se mantiene constante. Ello junto con el hecho de que la relación DPPC/DPPE sea aproximadamente 2 cuando la mezcla LPC/LPE es equimolecular y tenga un valor de 1.3 cuando la concentración de LPE en la mezcla es 2.6 veces mayor que la de LPC son datos concluyentes que ponen de manifiesto la mayor especificidad de la enzima por la lisofosfatidilcolina.

Con respecto a la actividad de hidrólisis de la enzima con monómeros de LPC y LPE como sustratos, hemos comprobado que la hidrólisis de la LPE aumenta progresivamente a medida que incrementa el % molar de LPE en la mezcla, disminuyendo al mismo tiempo la hidrólisis de LPC (Figura 35).

La relación  $^{14}\text{C} / ^3\text{H}$  para los ácidos grasos comparado con la relación  $^{14}\text{C} / ^3\text{H}$  para los sustratos, se recogen en la tabla IX.

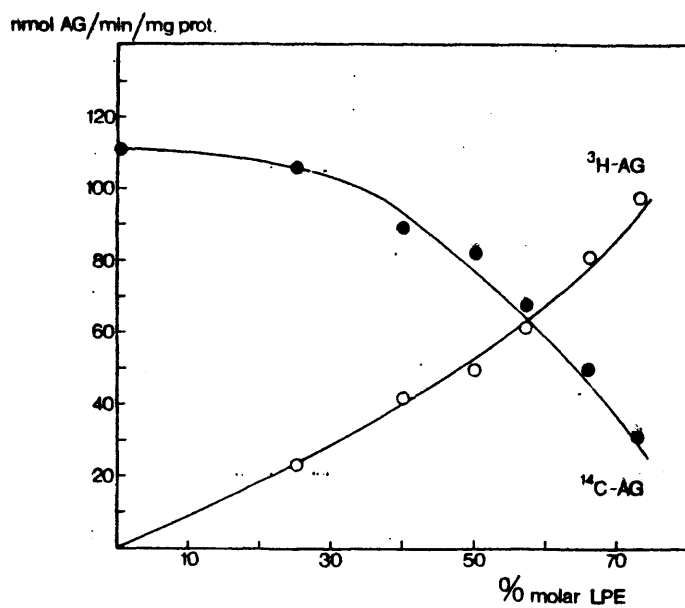


Fig. 35.— Actividad hidrolítica de la enzima con una mezcla de LPC y LPE. Formación de  $^{14}\text{C-AG}$  (●-●) y  $^3\text{H-AG}$  (○-○). Las incubaciones se realizaron como se describe en la figura 34.

Tabla IX.— Especificidad de la enzima por LPC y LPE como donadores de acilo

% molar de LPE en la mezcla	Relación $^{14}\text{C} / ^3\text{H}$	
	Acidos grasos	Lisofosfolípidos
25	4.6	3
40	2	1.5
50	1.8	1
57	1.1	0.75
66	0.55	0.5
73	0.3	0.375

Estos resultados indican que la enzima manifiesta la misma especificidad por LPE que por LPC en forma monomérica ya que las relaciones  $^{14}\text{C-AG}/^3\text{H-AG}$  y  $^{14}\text{C-LPC}/^3\text{H-LPE}$  son similares, lo que corrobora la observación planteada anteriormente de que la enzima es más específica por el aceptor de acilo que por el donador de acilo.

En base a la variación de las relaciones PC/PE y  $^{14}\text{C-AG}/^3\text{H-AG}$  en función del incremento del % molar de LPE en la mezcla, hemos elaborado un modelo de comportamiento de los análogos, que en síntesis es:

- a) Si la especificidad de la enzima es mayor por LPC que por el análogo, la velocidad de hidrólisis de LPC y de formación de PC será igual o mayor que la del control. El porcentaje de incremento sobre el control depende del grado de especificidad de la enzima por LPC con respecto al análogo.
- b) Si la especificidad de la enzima por LPC es igual o menor que por el análogo, la velocidad de hidrólisis de LPC y de formación de PC será menor que la del control. El porcentaje de disminución sobre el control depende del grado de selectividad de la enzima por el análogo.

Estas consideraciones son importantes en la interpretación de los estudios de competitividad entre el sustrato  $^{14}\text{C-LPC}$  y los análogos no marcados radioactivamente que han sido utilizados en este trabajo, debido a la no disponibilidad comercial del precursor marcado.

#### III.8.1.2. Estudios de competitividad entre 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfodimetiletanolamina y $1\text{-}^{14}\text{C}$ palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

En la figura 36 se representa la variación de las actividades de hidrólisis y transacilación en función del incremento del % molar de palmitoil-sn-glicero-3-fosfodimetiletanolamina (LPDME) en la mezcla. Injustificablemente, este lisofosfolípido es un sustrato ineficaz tanto como donador como aceptor de acilo, manifestándose una especificidad mucho mayor por  $^{14}\text{C-LPC}$ .

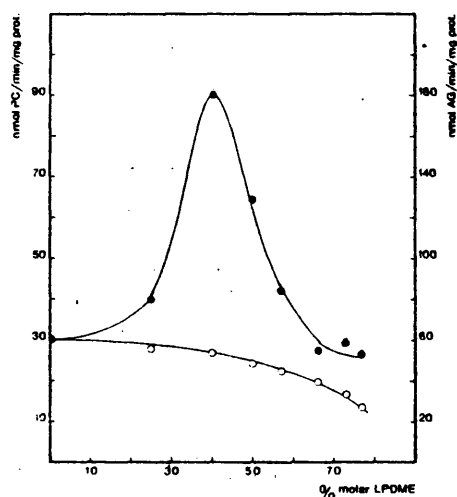


Fig. 36.— Actividades transacilífica (●—●) e hidrolítica (○—○) de la enzima en presencia de micelas mixtas de 1-<sup>14</sup>C-palmitoil-es-glicero-3-fosfolina y 1-palmitoil-es-glicero-3-fosfodimetilanolamina. Las actividades se expresan como porcentajes sobre el valor control. Los ensayos enzimáticos se realizaron como se describe en la figura 34.

### III.8.2. Especificidad respecto a la zona hidrófoba del sustrato

Se ha estudiado la influencia de la cadena hidrocarbonada de la lisofosfatidilcolina en las actividades de hidrólisis y transacilación mediante experimentos de competencia entre el sustrato y distintas especies moleculares de LPC que difieren en el grado de saturación y longitud de la cadena de acilo.

En la tabla X se observa la disminución de los productos de reacción sobre el control para los cuatro análogos utilizados a concentración equimolecular con palmitoil-LPC marcada.

La disminución próxima al 50% con estearoil-LPC tanto en la transacilación como en la hidrólisis sugiere que esta especie molecular es un sustrato tan eficaz como la palmitoil-LPC.

Los análogos de cadena corta son menos efectivos para la reacción de hidrólisis y de transacilación que la estearoil-LPC o palmitoil-LPC. Es interesante observar que si bien la Lauroil-LPC y miristoil-LPC disminuyen la producción de ácidos grasos en un 38%, con respecto a la reacción de transacilación la miristoil-LPC es 1.5 veces más eficaz que la lauroil-LPC.

Por otro lado, la oleoil-LPC tiene un efecto similar a la estearoil-LPC en la disminución de la velocidad de hidrólisis, sin embargo es 2 veces menos efectiva respecto a la reacción de transacilación.

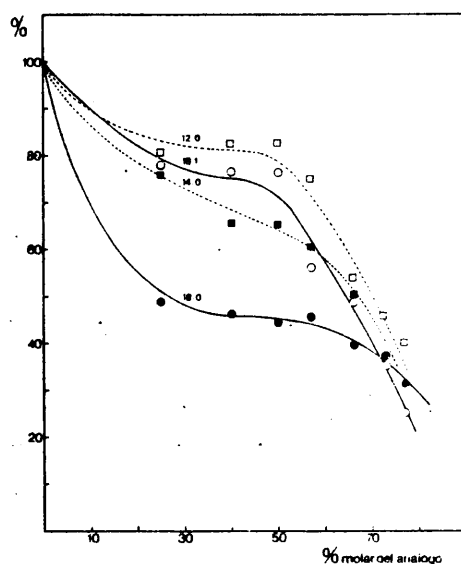


Fig. 37. - Competencia entre  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC y distintas especies moleculares de LPC en la formación de PC. La actividad transacilásica (expresada como el porcentaje sobre el valor control) se representa frente al incremento del % molar del análogo en la mezcla.

Diferentes cantidades (0.1-1  $\mu\text{moles}$ ) de análogos no marcados se sonicaron con 0.3  $\mu\text{moles}$  de  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC (0.05  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) en 0.5 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.5. La reacción se inició por adición de 0.09 mg de enzima en 0.5 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.5, conteniendo NaCl 0.1 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 2.5 mM y glicerol al 2.5% y se incubó durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Lauroil-LPC (12:0) ( $\circ$ - $\circ$ ); Miristoil-LPC (14:0) ( $\square$ - $\square$ ); Esteoil-LPC (16:0) ( $\triangle$ - $\triangle$ ); Oleoil-LPC (18:1) ( $\bullet$ - $\bullet$ ).

El comportamiento diferente observado con lauroil-LPC y oleoil-LPC con respecto a las actividades de hidrólisis y transacilación puede ser debido fundamentalmente a las propiedades físico-químicas de estos sustratos. En este sentido tenemos que considerar que la CMC aumenta al disminuir la longitud de la cadena hidrocarbonada o en presencia de enlaces cis etilénicos. En definitiva, la hidrofobicidad de las moléculas anfipáticas favorece la formación de la micela (Helenius y Simons, 1975) por lo que en mezclas equimoleculares de  $^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC y lauroil-LPC u oleoil-LPC las micelas estarán más enriquecidas en palmitoil-LPC siendo necesarias concentraciones superiores de los análogos para que manifiesten un efecto competitivo significativo con respecto a la formación de DPPC.

Esto viene corroborado en la figura 37 en la que se recoge la competencia entre  $1\text{-}^{14}\text{C}$  palmitoil-LPC y distintas especies moleculares en la formación de PC. Podemos observar que sólo cuando el % molar de lauroil-LPC u oleoil-LPC en la mezcla es superior al 50% se produce una inhibición significativa de la síntesis de dipalmitoil fosfatidilcolina, lo que no es tan acusado para



miristoil-LPC. En contraste, la estearoil-LPC a bajas concentraciones en la mezcla causa una marcada inhibición de la síntesis de DPPC lo que es consistente con la mayor hidrofobicidad de la molécula de estearoil-LPC con respecto a la de palmitoil-LPC.

Tabla X.— Disminución de las actividades de transacilación e hidrólisis con mezclas equimoleculares de  $^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC y los análogos lauroil-LPC (12 : 0); miristoil-LPC (14 : 0); estearoil-LPC (18 : 0) y oleoil-LPC (18 : 1)

Mezclas equimoleculares	Actividad	
$^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC/análogos	% disminución de $^{14}\text{C}$ -PC y $^{14}\text{C}$ -AG sobre el control	
	Transacilación	Hidrólisis
12 : 0	20	37
14 : 0	34	38
18 : 0	56	56
18 : 1	22	50

Las especies lauroil y oleoil-LPC presentan curvas de competición similares respecto a la reacción de transacilación y difieren, sin embargo, en relación a la reacción de hidrólisis, siendo las curvas similares para oleoil y estearoil (Figura 38).

Finalmente, podríamos concluir que si bien todas las especies moleculares de LPC estudiadas son sustratos de la enzima, las especies con cadenas hidrocarbonadas más largas son más efectivas como donadores de acilo, mientras que con respecto a la reacción de transacilación hay que tener en cuenta no sólo la longitud de la cadena sino el grado de saturación, siendo las especies más hidrofóbicas las más eficaces.

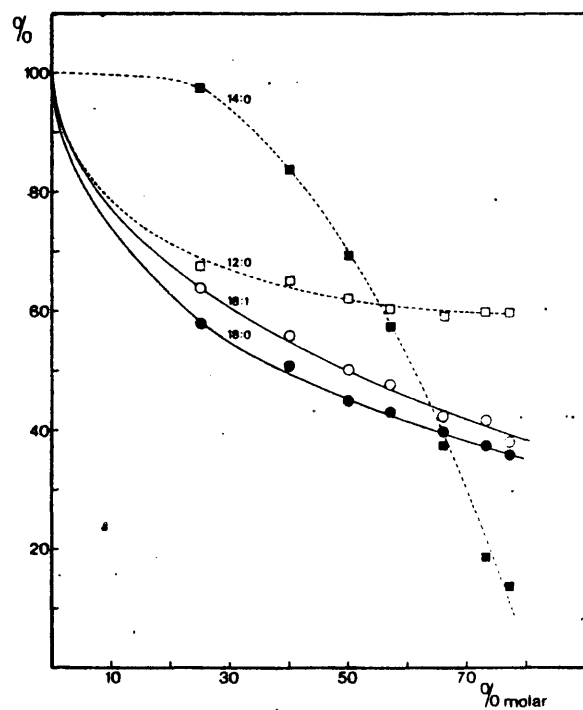


Fig. 38.— Actividad hidrolítica de la enzima con la forma monomérica de  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitoil-LPC y otras especies moleculares de LPC. Las incubaciones se realizaron como se describe en la figura 37.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

La enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* de pulmón de conejo, cataliza dos tipos de reacciones: la hidrólisis de lisofosfatidilcolina dando lugar a ácidos grasos y glicero-3-fosfocolina y la transferencia de acilo entre dos moléculas de 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina produciendo dipalmitoilfosfatidilcolina y glicero-3-fosfocolina.

Varios hechos ponen de manifiesto que una única enzima es responsable de ambas actividades y que por tanto, la actividad de hidrólisis no se debe a la contaminación de una lisofosfolipasa presente en la fracción soluble:

- 1) Se purifican conjuntamente hasta 80 veces.
- 2) La electroforesis de la enzima purificada en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol proporciona una única banda de proteína.
- 3) Las actividades transacilásica e hidrolítica desaparecen de forma paralela por modificación de las condiciones ambientales, en presencia de inhibidores y por otros tratamientos especificados en la discusión de los resultados.

La enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* se localiza exclusivamente en la fracción soluble, no detectándose las actividades de hidrólisis y transacilación en los cuerpos lamelares, microsomas y mitocondrias. Por otra parte, dichos orgánulos subcelulares no contienen ningún factor estimulante de la enzima.

El hecho de que no se detecten ambas actividades en la fracción microsomal y de que por otra parte, no hayamos encontrado acilación directa de la lisofosfatidilcolina en la fracción soluble, permite descartar la posibilidad de que una sola enzima sea responsable de la síntesis de la dipalmitoilfosfatidilcolina. En este sentido, dos enzimas diferentes estarán implicados en el mecanismo de remodelación: la *lisolecitina aciltransferasa* dependiente de CoA y ATP de fracción microsomal, y la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* no dependiente de CoA y ATP, de fracción soluble.

La cuestión que se plantea es:

¿La *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* es una enzima biosintética o bien es una enzima hidrolítica, siendo la actividad transacilásica un artefacto del medio de estudio *in vitro*?

En base a los resultados obtenidos, que resumiremos a continuación, concluimos que se trata de una enzima implicada en la síntesis del componente mayoritario del surfactante pulmonar: dipalmitoilfosfatidilcolina, siendo la hidrólisis del sustrato consecuencia del estudio *in vitro* en un medio acuoso, en el que la lisofosfatidilcolina se encuentra en dos formas: monomérica y micelar y en el que, por otra parte, la estructura de la enzima podría estar de alguna manera alterada conduciendo a un intermedio enzima-ácido graso inestable y por tanto susceptible de

hidrólisis.

Asimismo, hemos comprobado que una relación hidrólisis/transacilación menor o igual a 2 es un índice de la funcionalidad normal de la enzima en las condiciones óptimas de pH, fuerza iónica, concentración de proteínas y concentración de sustrato en las que se trabaja. La variación de estos parámetros, así como la presencia de lípidos en el medio o de  $Mg^{2+}$  conducen a una modificación de dicha relación. En este sentido, se han considerado en todo momento las condiciones ambientales y su incidencia, no sólo en la proteína sino también en la molécula del sustrato cuyas propiedades físico-químicas son determinantes en la interpretación de los resultados.

La enzima es monomérica ya que su peso molecular, de aproximadamente 60.000D, calculado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS y de  $\beta$ -mercaptoetanol, coincide con el estimado en una columna de ACA-44 calibrada.

La enzima manifiesta una fuerte tendencia a agregarse a fuerzas iónicas altas o bajas. El agregado presenta una elevada estabilidad ya que no se disocia en sus constituyentes. Probablemente, la formación de agregados se deba a la asociación de la *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* con otras proteínas ya que la enzima en forma no agregada no es capaz de asociarse consigo misma, al menos a concentraciones de proteína bajas.

La adición de lípidos a concentraciones comprendidas entre 0.01-0.1 mM (DPPC, ácido palmítico o tripalmitina) y especialmente de una mezcla de lípidos (PC/PE/colesterol, 35/25/40) que simula la estructura y el comportamiento de los lípidos que constituyen la membrana, da lugar a un incremento de la actividad transacilásica acompañado de una disminución de la actividad hidrolítica. Sin embargo, la adición del sistema mixto a concentraciones superiores a 0.4 mM conduce a una disminución de la actividad transacilásica, inhibiéndose ambas actividades a concentraciones superiores a 1 mM. Ello es debido a la adsorción del sustrato en forma micelar a la fase lipídica, no siendo accesible al centro activo de la enzima y/o a la incidencia directa de los lípidos, a concentraciones elevadas, en la proteína.

El ácido palmítico, a concentraciones superiores a 0.3 mM, tiene un claro efecto inhibitor sobre las dos actividades de la enzima. Ya que el ácido palmítico no se comporta como detergente a pH neutro, la inhibición debemos atribuirle a un efecto de adsorción del ácido graso en la enzima que bloquee la accesibilidad del sustrato o bien a un efecto de unión entre el ácido graso y el sustrato para formar una organización de tipo bicapa.

Respecto a los estudios cinéticos concluimos que:

- a) La reacción de transacilación sólo tiene lugar cuando el sustrato está formando agregados micelares. En este sentido la curva  $V$  Vs  $S$  que describe la actividad transacilásica se desvía significativamente de la hipérbola rectangular típica, siendo de naturaleza sigmoidea, de manera que la síntesis de fosfatidilcolina comienza a concentraciones de sustrato superiores a la concentración micelar crítica.

$$K_{M_{TRANS}} = K_{M_{mi}} = 33,8 \pm 0,2 \mu M$$

$$V_{M_{TRANS}} = V_{M_{mi}} = 15,22 \pm 2,1 \text{ nmoles/min/mgr proteína}$$

- b) La curva que describe la velocidad de hidrólisis en función del incremento de la concentración de lisofosfatidilcolina, a concentraciones superiores e inferiores a la concentración micelar crítica sigue una cinética de Michaelis Menten, lo que demuestra que la actividad hidrolítica de la enzima sólo se manifiesta cuando el sustrato se une a la enzima en forma monomérica.

$$KM_H = KM_{mo} = 10.7 \pm 0.1 \mu M$$

$$VM_H = VM_{mo} = 30.3 \pm 0.9 \text{ nmoles/min/mgr proteína}$$

- c) Se producen de forma paralela dos reacciones diferentes con la misma enzima y con el mismo sustrato debido a que éste se encuentra en dos formas distintas en solución acuosa, siendo los valores de  $E_a$ :

$$E_{a_{\text{transacilación}}} = 8.70 \text{ Kcal/mol}$$

$$E_{a_{\text{hidrólisis}}} = 8.25 \text{ Kcal/mol}$$

El hecho de que los valores de energía de activación sean tan similares para la reacción de hidrólisis y de transacilación sugiere que posiblemente la fase limitante de velocidad es la donación del acilo, ya que la formación del complejo acil-enzima es común para ambas reacciones:

Respecto a las propiedades enzimáticas de la enzima hemos comprobado que:

- a) La enzima en forma no agregada requiere para su actividad un medio con fuerza iónica de 0.1 M. En contraste, la proteína en forma agregada (asociada a otras proteínas) o en fracción soluble no es dependiente de la fuerza iónica del medio.

La eliminación de la fuerza iónica conduce a una pérdida de la actividad transacilásica del 90%, produciéndose una recuperación del 50% por adición de NaCl 0.2 M. En contraste la actividad hidrolítica aumenta muy significativamente por la eliminación de la fuerza iónica del medio.

- b) El pH óptimo para la actividad transacilásica está comprendido en el intervalo [6.8-7.8]. Sin embargo se ha comprobado que la relación hidrólisis/transacilación aumenta a valores superiores a 2 a pH > 6.8.
- c) Ambas actividades no son dependientes de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ . Por otra parte, el hecho de que concentraciones de  $Mg^{2+}$  superiores a 3 mM inhiban la actividad transacilásica y estimulen la actividad hidrolítica sugiere la posibilidad de que el  $Mg^{2+}$  afecte al equilibrio monómero  $\rightleftharpoons$  micela.
- d) Las actividades de hidrólisis y transacilación se inhiben por tratamiento térmico a temperaturas superiores a 50°C.
- e) Las velocidades de hidrólisis y transacilación se mantienen constantes a lo largo del tiempo hasta 30 minutos. Sin embargo la relación hidrólisis/transacilación disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación.

- f) Debido a la naturaleza lipídica de la molécula del sustrato y a sus propiedades físico-químicas, las curvas  $v$  vs  $E$  son en algunas ocasiones atípicas. En este sentido hemos comprobado que si bien la actividad transacilásica varía linealmente con el incremento de la concentración de proteína en un intervalo de 0.001-0.18 mgr de proteína/ml, la actividad hidrolítica sólo es lineal hasta 0.03 mgr/ml. Por otra parte se encontró que ambas actividades son lineales con el incremento de la concentración de proteína de fracción soluble hasta 0.5 mgr de proteína/ml. A concentraciones superiores la formación de ácidos grasos se mantiene constante mientras que la síntesis de fosfatidilcolina disminuye progresivamente debido a la adsorción de las demás proteínas de dicha fracción a la forma agregada del sustrato con un peso molecular del orden de  $10^5$ .
- g) La inhibición de ambas actividades que se produce por tratamiento con  $\text{ICH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$  10 mM, unido a la necesidad de la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol para mantener la enzima activa, indica que uno o mas grupos  $-\text{SH}$  deben contribuir directa o indirectamente a la catálisis enzimática.

Respecto a la especificidad de la enzima podemos concluir:

- a) La *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* es altamente específica para lisofosfolípidos tanto como donadores como aceptores de acilo.
- b) El reconocimiento de la cabeza polar de la molécula del sustrato no se lleva a cabo por interacciones electrostáticas ya que fuerzas iónicas elevadas no inhiben las actividades de hidrólisis y transacilación de la enzima. Por otra parte, el hecho de que la enzima manifieste mayor especificidad por  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina que por  $1\text{-}[(9,10)\text{-}^3\text{H}_2]$  palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y que 1-palmitoil-*sn*-3-glicero-3-fosfodimetiletanolamina no sea sustrato de la enzima indica que los grupos metilo de la colina deben estar implicados en el reconocimiento de la zona hidrofílica del sustrato, quizás por interacciones hidrofóbicas.
- c) La enzima es más específica por el aceptor de acilo que por el donador de acilo con respecto a la zona hidrofílica del sustrato.
- d) Con respecto a la especificidad por la zona hidrofóbica de la molécula de lisofosfatidilcolina hemos comprobado que si bien todas las especies de lisofosfatidilcolina estudiadas (lauroil-LPC, miristoil-LPC, estearoil-LPC, palmitoil-LPC y oleoil-LPC) son sustratos de la enzima, las especies con cadenas hidrocarbonadas más largas son más efectivas como donadores de acilo en la reacción de hidrólisis, mientras que con respecto a la reacción de transacilación hay que tener en cuenta no sólo la longitud de la cadena sino el grado de insaturación, siendo las especies más hidrofóbicas las más eficaces.

Finalmente, con los datos de que disponemos no podemos establecer ninguna

conclusión definitiva respecto a la contribución de esta enzima en la síntesis de dipalmitoil fosfatidilcolina en pulmón *in vivo*. Desde un punto de vista fisiológico, la contribución de la enzima *lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa* o de la enzima *lisolecitina aciltransferasa* en la síntesis de DPPC debe depender de los niveles y la naturaleza de los precursores disponibles en las células, de manera que, cuando la concentración de palmitoil-CoA en la célula sea fisiológicamente alta el mecanismo predominante es el de desacilación-reacilación, mientras que a concentraciones bajas del precursor palmitoil-CoA la ruta más efectiva será la desacilación-transacilación. De esta manera, se aseguran los niveles necesarios de DPPC para el funcionamiento normal del pulmón, en cualquier situación energética de los pneumocitos tipo II.

## V. BIBLIOGRAFIA

1. Aarsman, A.J. y Van den Bosch, H. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 572, 519-530.
2. Aarsman, A.J. y Van den Bosch, H. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 620, 3, 410-417.
3. Abdellatif, M.M. y Hollingsworth, M. (1979). *Br. J. Pharmacol.* 66, 142-143.
4. Abe, M., Akino, T. y Ohno, K. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 280, 275-280.
5. Abe, M. y Akino, T. (1973). *Tohoku J. Exp. Med.* 110, 167-172.
6. Abe, M., Ohno, K. y Sato, R. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 369, 361-370.
7. Agranoff, B.W. y Hajra, A.K. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 411-415.
8. Akino, T., Abe, M. y Arai, T. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 248, 274-281.
9. Akino, T., Yamazaki, I. y Abe, M. (1972) *Tohoku J. Exp. Med.* 108, 133-139.
10. Akino, T., Kawamoto, T. y Ohno, K. (1978) *Tohoku J. Exp. Med.* 124, 307-322.
11. Anderson, G.G., Gidlowski, J.A., Absher, P.L., Hewitt, J.R. y Douglas, W.H.J. (1978) *Prostaglandins* 16, 923-929.
12. Balin, J.A., Beelen, D.A., Kyriakides, E.C. y Treble, D.H. (1975) *Chest.* 67 (suppl.) 215-225.
13. Ballard, P.L. y Ballard, R.A. (1974) *J. Clin. Invest.* 53, 477-486.
14. Baranska, J. y Van Golde, L.M.G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 488, 285-293.
15. Basset, D.J.P., Rabinowitz, J.L., Hamosh, M. y Hamosh, P. (1979) *Am. Rev. Respir. Dis.* 119, 288-292.
16. Basu, M.K., Colacicco, G., Picciano, P.T., Roienbaum, R.M. y Wittner, M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 2, 349-359.
17. Batenburg, J.J., Longmore, W.J. y Van Golde, L.M.G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 529, 160-170.
18. Batenburg, J.J., Longmore, W.J., Klazinga, W. y Van Golde, L.M.G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 573, 136-144.
19. Bhattacharyya, S.N., Passero, M.A., Di Augustine, R.P. y Lynn, W.S. (1975) *J. Clin. Invest.* 55, 914-920.
20. Bleasdale, J.E., Walis, P., Macdonald, P.C. y Johnston, J.M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 575, 135-147.
21. Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
22. Brehier, A., Benson, B.L., Williams, C., Mason, R.J. y Ballard, P.L. (1977) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 71, 3, 883-890.



23. Brumley, G. y Van den Bosch, H. (1977) *J. Lipid Res.* 18, 523-532.
24. Buechler, K.F. y Rhoades, R.A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 619, 186-195.
25. Casola, P.G., Yeung, A., Fellows, F. y Possmager, F. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 2, 627-633.
26. Caffrey, M. y Kinsella, J.E. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 2, 484-491.
27. Caffrey, M. y Kinsella, J.E. (1977) *J. Lip. Res.* 18, 44-52.
28. Clements, J.A., Brown, E.S. y Johnson, R.P. (1958) *J. Appl. Physiol.* 12, 262-268.
29. Coleman, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 300, 1-30.
30. Coleman, R. y Bell, R.M. (1978) *J. Cell. Biology* 76, 245-253.
31. Clements, J.A. (1970) *Science* 164, 603-604. *Am. Rev. Respir. Dis.* 101, 984-990.
32. Corbet, A.J.S., Flax, P. y Rudolph, A.J. (1977) *J. Appl. Physiol.* 43, 1039-1045.
33. Corran, P.H. y Waley, S.G. (1975) *Biochem. J.* 145, 335-344.
34. Cunningham, M.D., Desai, N.S., Thompson, S.A. y Greene, J.M. (1978) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 131, 719-724.
35. Chapman, G.E., Hartman, P.G. y Bradbury, E.E. (1976) *Eur. J. Biochem.* 6, 69-73.
36. Chapman, D.P., Kingston, W.E. y Lilley, T.H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464, 260-275.
37. Delahunty, I.J. y Johnston, J.M. (1979) *Lung* 157, 45-51.
38. Dermer, G.B. (1970) *J. Ultrastruct. Res.* 33, 306-317.
39. Desai, R., Tetley, T.D., Curtis, C.G., Powell, G.M. y Richards, R.J. (1978) *Biochem. J.* 176, 455-462.
40. Dittmer, J.C. y Lester, R.L. (1964) *J. Lipid. Res.* 5, 126.
41. Dobbs, L.G. y Mason, R.J. (1979) *J. Clin. Invest.* 63, 378-387.
42. Dobbs, L.G., Geppert, E.F., Williams, M.C., Greenleaf, R.D. y Mason, R.J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 618, 510-523.
43. Engle, M.J., Sanders, R.L. y Longmore, W.J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 586-595.
44. Engle, M.J., Sanders, R.L. y Douglas, W.H.J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 617, 225-236.
45. Engle, M.J., Sanders, R.L. y Longmore, W.J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1, 23-28.
46. Erbland, J.F. y Marinetti, G.V. (1962) *Fed. Proc.* 21, 295.
47. Erbland, J.F. y Marinetti, G.V. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 106, 128-138.
48. Evans, J.G., Cabral-Anderson, L.J., Freeman, G. (1978) *Lab. Invest.* 38, 648.

49. Faridy, E.E. (1975) *J. Appl. Physiol.* 39, 535-540.
50. Farrell, P.M. y Zachman, R.D. (1973) *Science* 179, 297-298.
51. Feldman, D.A., Kovac, C.R., Dranginis, P.L. y Weinhold, P.A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 14, 4980-4986.
52. Finkelstein, J.N. y Mavis, R.D. (1978) *Fed. Prod.* 37, 1820.
53. Fisher, A.B., Huber, G.A., Funa, L., Bassett, D. y Rabinowitz, J.L. (1976) *J. Lab. Clin. Med.* 87, 1033-1040.
54. Frosolono, M.F., Slivka, S. y Charms, B.L. (1971) *J. Lipid. Res.* 12, 96-103.
55. Funkhove, J.D. y Hughes, E.R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 530, 9-16.
56. Funkhove, J.D. y Hughes, E.R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 619, 506-514.
57. Gail, D.B., Massaro, G.D. y Massaro, D. (1977) *J. Appl. Physiol.* 42, 88-92.
58. Gail, D.B., Steinkamp, H. y Massaro, D. (1978) *Respir. Physiol.* 33, 289-297.
59. Garcia, A., Newkirk, J.D. y Mavis, R.D. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64, 128-135.
60. Gatt, S. y Bartfai, T. (1977a) *Biochim. Biophys. Acta* 488, 1-12.
61. Gatt, S. y Bartfai, T. (1977b) *Biochim. Biophys. Acta* 488, 13-24.
62. Gil, J., Reiss, O.K. (1973) *J. Cell. Biol.* 58, 152-171.
63. Gil, J. (1976) *Rev. Franc. Mal. Resp., Suppl.* 3-4, 43-48.
64. Goerke, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 344, 241-261.
65. Gottschall, J.L., Walzer, P.D. y Yoneda, K. (1979) *Lab. Invest.* 41, 1, 5-12.
66. Gove, C.D. y Hems, D.A. (1978) *Biochem. J.* 170, 1-8.
67. Gray, M.E., Liao, S., Stahlman, M. y Le Quire, V.S. (1974) *Fed. Proc.* 33, 224.
68. Groener, J.E.M. y Van Golde, L.M.G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 529, 88-95.
69. Gross, I., Wilson, C.M. y Rooney, S.A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 528, 190-198.
70. Hallman, M. y Raivio, K. (1974) *Pediatr. Res.* 8, 874-879.
71. Hallman, N. y Gluck, L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 409, 172-191.
72. Hallman, M. y Raivio, K.I. (1975) *Biol. Neonat.* 27, 329-338.
73. Hallman, M. y Gluck, L. (1976) *J. Lipid. Res.* 17, 257-262.
74. Hallman, M., Miyar, K. y Wagner, R.M. (1976a) *Lab. Invest.* 35, 79-86.
75. Hallman, M., Kulovich, M.V., Kirkpatrick, E., Sugarman, R.G. y Gluck, L. (1976b) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125, 613-617.
76. Hallman, M., Fedman, B.H., Kirkpatrick, E. y Gluck, L. (1977) *Pediatr. Res.* 11, 71.
77. Hallman, M. y Epstein, B.L. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 4, 1151.



78. Hasegawa-Sasaki, H. y Ohno, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 380, 486-495.
79. Hass, M.A. y Longmore, W.J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 573 166-174.
80. Hayase, K.S., Parthasarathy, S., Eppler, C.M. y Baumann, W.J. (1980) *J. Lipid. Res.* 21, 484-488.
81. Heath, M.F. y Jacobson, W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 441, 443-452.
82. Helenius, A. y Simons, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79.
83. Hendry, A.T. y Possmayer, F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 369, 156-172.
84. Hildebran, J.N., Goerke, J. y Clements, J.A. (1979) *J. Appl. Physiol.* 47, 604-611.
85. Holub, B.J., Piekarski, J. y Possmayer, F. (1980) *Can. J. Biochem.* 58, 434-439.
86. Jain, M.K., Van Echteld, C.J.A., Ramirez, F., De Gier, J., De Haas, G.H. y Van Deenen, L.L.M. (1979) *Nature* 284, 486-487.
87. Jelsema, C.L. y More, D.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7960-7971.
88. Jimenez, J.M. y Johnston, J.M. (1976) *Pediatr. Res.* 10, 767-769.
89. Jobe, A., Kirkpatrick, E. y Gluck, L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 11, 3810-3816.
90. Jobe, A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572 404-412.
91. Jobe, A., Ikegami, M. y Sartori-Miller, I. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 617, 65-75.
92. Kanoh, H. y Ohno, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 380, 199-207.
93. Karberg, R. y Cherry, R.B., Escardo, F.E. y Koch, G. (1962) *Acta Paediat.* 51, 121-135.
94. Khosla, S.S., Gobran, L.I. y Rooney, S.A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 617, 282-290.
95. Kuksis, A., Marai, L., Breckenridge, W.C., Gornall, D.A. y Stacknyk, O. (1968) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 46, 511.
96. Kimelberg, H.K. (1976) *Molecular and Cellular Biochemistry* 10, 3, 171-188.
97. King, R.J. y Clements, J.A. (1972) *Am. J. Physiol.* 223, 715-726.
98. King, R.J. (1974) *Fed. Proc.* 33, 2238-2247.
99. King, R.J. (1979) *Fed. Proc.* 38, 2637-2643.
100. King, R.J. y Martin, H. (1979) *Fed. Proc.* 38, 1436.
101. Kyriakides, E.C., Beeler, D.A., Edmonds, R.H. y Balint, J.A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 431, 399-407.
102. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
103. Lai, C.Y., Nakai, N. y Chang, D. (1974) *Science* 183, 1204-1206.
104. Lands, W.E.M. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2233-2237.
105. Lin, Y.N., Wassef, M.K. y Horowitz, M.I. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 193, 213-220.
106. Longmore, W.J., Oldenborg, V. y Van Golde, L.M.G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572, 452-460.

107. Longmuir, K.J. y Johnston, J.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 620, 500-508.
108. Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
109. Marai, L. y Kuksis, A. (1969) *J. Lipid Res.* 10, 141.
110. Marino, P.A. y Rooney, S.A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 620, 509-519.
111. Mason, R.J., Huber, G. y Vaughan, M. (1972) *J. Clin. Invest.* 51, 68-73.
112. Mason, R.J., Williams, M.C., Greeleaf, R.D. y Clements, J.A. (1977) *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 1015-1026.
113. Mason, R.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 10, 3367-3370.
114. Mason, R.J. y Dobbs, L.G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11, 5101-5107.
115. Mason, R.J. y Williams, M.C. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 617, 36-50.
116. Mavis, R.D., Finkelstein, J.N. y Hall, B.P. (1978) *J. Lipid Res.* 19, 467-477.
117. Mead, J. y Collier, C. (1959) *J. Appl. Physiol.* 14, 669-678.
118. Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. y Pelka, J.R. (1966) *Analyt. Chem.* 38, 514-518.
119. Mims, L.C. y Pascale, J.A. (1979) *Biol. Neonate* 35, 90-94.
120. Nakamura, M., Kawamoto, T. y Akino, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 620, 24-36.
121. Nathanielsz, P.W. (1978) *Annu. Rev. Physiol.* 40, 411-445.
122. Okano, G. y Akino, T. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 528, 373-384.
123. Oldenborg, V. y Van Golde, L.M.G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 441, 433-442.
124. Oldenborg, V. y Van Golde, L.M.G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 489, 454-465.
125. Oyarzun, M.J. y Clements, J.A. (1977) *J. Appl. Physiol.* 43, 39-45.
126. Oyarzun, M.J. y Clements, J.A. (1978) *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 879-891.
127. Pattle, R.E. (1958) *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B* 148, 217-240.
128. Petrik, P. y Collet, A.J. (1974) *Amer. J. Anat.* 139, 519-534.
129. Pflieger, R.C., Henderson, R.F. y Waide, J. (1972) *Chem. Phys. Lipids* 9, 51-68.
130. Popjak, G. y Beekmans, M. (1950) *Biochem. J.* 47, 233-238.
131. Possmayer, F., Duwe, G., Hahn, M. y Buchnea, D. (1977) *Can. J. Biochem.* 55, 609-617.
132. Possmayer, F., Duwe, G., Metcalfe, R., Stewart Dehaan, P.J., Wong, C., Las Heras, J. y Harding, P.G.R. (1977) *Biochem. J.* 166, 485-494.
133. Possmayer, F., Casola, P.G., Chan, F., Hill, S., Metcalfe, I.L., Stewart-Dehaan, P.J., Wong, T., Las Heras, J., Gammal, E.B. y Harding, P.G.R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 574, 197-211.
134. Powell, W.S. y Solomon, S. (1978) *Prostaglandins* 15, 351-364.

135. Rao Ravinuthala, H.R., Miller, J.C. y Weinhold, P.A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 530, 347-356.
136. Rodney, E.V., Stephenson, L.L. y Farrell, P.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 531, 295-300.
137. Rooney, S.A., Gross, I., Gassenheirmer, L.N. y Motoyama, E.K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 398, 433-441.
138. Rooney, S.A., Page-Roberts, B.A. y Motoyama, E.K. (1975) *J. Lipid. Res.*, 16, 418-425.
139. Rooney, S.A., y Motoyama, A.K. (1976) *Clin. Chim. Acta* 69, 525-529.
140. Rooney, S.A., Wai-Lee, T.S., Gobran, L. y Motoyama, E.K. (1976a) *Biochim. Biophys. Acta*, 431, 447-458.
141. Rooney, S.A., Gobran, L., Cross, I., Wai-Lee, T.S., Nardone, L.L. y Motoyama, E.K. (1976b) *Biochim. Biophys. Acta* 450, 121-130.
142. Rooney, S.A., Gobran, L.I. y Wai-Lee, T.S. (1977) *J. Clin. Invest.* 60, 754-759.
143. Rooney, S.A. y Gobran, L.I. (1977) *J. Lipid Res.* 8, 667-675.
144. Rooney, S.A., Gobran, L.I., Marino, P.A., Maniscalco, N.M. y Cross, I. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* 572, 64-76.
145. Ross, E. y Schatz, G. (1973) *Anal. Biochem.* 54, 304-306.
146. Rothman, J.E. y Lenard, J. (1977) *Science* 195, 743-753.
147. Rouser, G., Siakotos, A.N. y Fleischer, S. (1966) *Lipids* 1, 85-86.
148. Ryan, V.S., Ryan, J.W., Smith, D.S. (1975) *Tissue Cell*, 7, 587-599.
149. Sato, T. y Kauffman, S.L. (1980) *Lab. Invest.* 43, 1, 28-36.
150. Sanderman, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 209-237.
151. Sarzala, M.G. y Van Golde, L.M.G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 441, 423-432.
152. Sawada, H. (1977a) *Biochim. Biophys. Acta* 490, 44-48.
153. Sawada, H. (1977b) *Biochim. Biophys. Acta* 493, 196-201.
154. Schlossman, D.M. y Bell, R.M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5738-5744.
155. Scholz, R.W., Woodward, B.M. y Rhoades, R.A. (1972) *Am. J. Physiol* 223, 991-996.
156. Scholz, R.W. y Evans, R.M. (1977) *Am. J. Physiol* 232, 364-369.
157. Schultz, F.M., Jimenez, J.M., Mac Donald, P.C. y Johnston, J.M. (1974) *Gynecol Invest.* 5, 222-229.
158. Shapiro, D.L., Nardone, L.L., Rooney, S.A., Motoyama, E.K. y Muñoz, J.L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 530, 197-207.
159. Smith, F.B. y Kikkawa, Y. (1978) *Lab. Invest.* 38, 45-51.
160. Smith, F.B. y Kikkawa, Y. (1979) *Lab. Invest.* 40, 2, 172-177.

161. Smith, F.B. y Kikkawa, M.D., Diglid, C.A. y Dalen, R. (1980) *Lab. Invest.* 42, 3, 296-301.
162. Snyder, F. y Malone, B. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 66, 914-919.
163. Sober, H.A. (1968) *Handbook of Biochemistry. Selected data for Molecular Biology* (The Chemical Rubber Co., Cleveland Ohio).
164. Sorokin, S.P. (1967) *J. Histochem. Citochem.* 14, 884-897.
165. Spitzer, H.L., Rice, J.M., Mc Donald, P.C. y Johnston, J.M. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 66, 17-23.
166. Spitzer, H.L. y Johnston, J.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 531, 275-285.
167. Steinmetz, M.A. y Deal, W.C. (1966) *Biochemistry* 5, 1399.
168. Stratton, C.J. (1977a) *Tissue Cell*, 9, 285-300.
169. Stratton, C.J. (1977b) *Tissue Cell*, 9, 301-316.
170. Tabak, S.A. y Notter, R.H. (1975) *Fed. Proc.* 34, 426-431.
171. Tanford, C.H. y Reynolds, J.A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 133-170.
172. Tansey, F.A. y Frosolono, M.F. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 67, 1560-1566.
173. Taylor, L., Polger, P., Mc Ateer, J.A. y Douglas, W.H.J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572, 502-509.
174. Thannhauser, S.J., Benotti, J. y Boncoddio, N.F. (1946) *J. Biol. Chem.* 166, 669-675.
175. Tierney, D.F. (1974) *Ann. Rev. Physiol.* 36, 209-231.
176. Tierney, D.F. (1974) *Fed. Proc.* 33, II 2231-2237.
177. Tsao, F.H.C. y Zachma, R.D. (1977) *Pediat. Res.* II, 849-857 y 858-861.
178. Tsai, M.Y. y Marshall, J.G. (1979) *Clin. Chem.* 25, 682-685.
179. Van Golde, L.M.G. y Van Deenen, L.L.M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 125, 496-502.
180. Van Golde, L.M.G. (1976) *Amer. Rev. Resp. Dis.* 114, 997-1000.
181. Van Heusden, G.P.H. y Van den Bosch, H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 90, 3, 1000-1006.
182. Vereyken, J.M.A., Montfoort A.M. y Van Golde, L.M.G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 260, 70-81.
183. Vestmark, S.E. (1972) *Uppsala Lakareforen. Förh N.F.* 38, 1-4.
184. Vianen, G.M. y Van Den Bosch, H. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 373-385.
185. Von Neergaard, K. (1929) *Z. Gesamte Exp. Med.* 66, 373-394.
186. Wassef, M.K., Lin, Y.N. y Horowitz, M.I. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 528, 318-330.
187. Williams, M.C. (1977) *J. Cell. Biol.* 72, 260-277.
188. Wykle, R.L., Malone, B. y Snyder, F. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 181, 249-256.

189. Wykle, R.L., Malone, B., Blank, M.L. y Snyder, F. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 2, 526-537.
190. Yamada, K. y Okuyama, H. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 209-219.
191. Yoneda, K. (1977) *Lab. Invest.* 37, 447-453.
192. Yoneda, K. (1978) *Am. J. Pathol.* 93, 745-752.
193. Zilversmit, D.B. y Hughes, M.A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 469, 99-110.

---

Caras, I. y Shapiro, B. (1975) *Biochimim. Biophys. Acta* 409, 201-211.

Cullis P.R. y De Kruijff, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399-420.

Van Heusden, G.P.H., Reutelingsperger, C.P.M. y Van den Bosch, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 663, 22-23.

